

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2002 - 537764

(P2002 - 537764A)

(43)公表日 平成14年11月12日(2002.11.12)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	ターコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 39/095	4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00		A 6 1 P 31/04	4 B 0 6 4
39/095		37/04	4 B 0 6 5
A 6 1 P 31/04		C 0 7 K 14/22	4 C 0 8 4
37/04		16/12	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 75数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 596146(P2000 - 596146)

(86)(22)出願日 平成12年1月25日(2000.1.25)

(85)翻訳文提出日 平成13年7月30日(2001.7.30)

(86)国際出願番号 PCT/EP00/00561

(87)国際公開番号 W000/44904

(87)国際公開日 平成12年8月3日(2000.8.3)

(31)優先権主張番号 9902070.3

(32)優先日 平成11年1月29日(1999.1.29)

(33)優先権主張国 イギリス(GB)

(71)出願人 スミスクライン ビーチャム バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

ベルギー国 リキセンザール ビー 1330
ルー デ ランスティテュート 89

(72)発明者 ソナード, ジョエル

ベルギー国 リキセンザール ビー - 1330
,ルー デ ランスティテュート 89, スミ
スクライン ビーチャム バイオロジカル
ズ ソシエテ アノニム

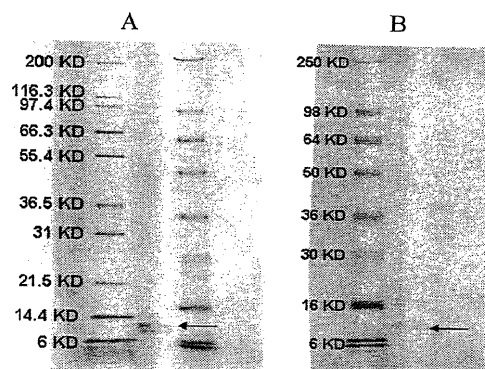
(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ナイセリア・メニンギチジス由来の B A S B 0 5 9 ポリペプチド

(57)【要約】

本発明は、BASB059ポリペプチドおよびBASB059ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドならびにかかるポリペプチドを組換え法により生産する方法を提供する。また、診断、予防および治療における使用も提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、単離されたポリペプチド。

【請求項2】 アミノ酸配列が配列番号2のアミノ酸に対して少なくとも95%の同一性を有する、請求項1に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項3】 配列番号2のアミノ酸を含んでなる、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項4】 配列番号2の単離されたポリペプチド。

【請求項5】 請求項1～4のいずれか1項に記載のポリペプチドの免疫原性断片であって、該免疫原性断片の免疫原性活性が配列番号2のポリペプチドのものと同質的に同一である、上記断片。

【請求項6】 配列番号2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド。

【請求項7】 配列番号1のポリヌクレオチドを含んでなる単離されたポリヌクレオチド。

【請求項8】 ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号1の配列またはその断片を有する標識プローブを用いて適当なライブラリーをスクリーニングすることによって得られる配列番号2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなる、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項9】 請求項6～8のいずれか1項に記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、発現ベクターまたは組換え生存微生物。

【請求項10】 請求項6～8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの発現方法であって、宿主細胞を該ポリヌクレオチドの少なくとも1つを含む発現ベクターで形質転換し、該宿主細胞を該ポリヌクレオチドのいずれか1つを発現させるのに十分な条件下で培養することを含む、上記発現方法。

【請求項11】 有効量の請求項1～5のいずれか1項に記載のポリペプチドおよび製薬上許容される担体を含むワクチン組成物。

【請求項12】 有効量の請求項6～8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドおよび製薬上許容される担体を含むワクチン組成物。

【請求項13】 少なくとも1種の他のナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)抗原を含む、請求項11または12に記載のワクチン組成物。

【請求項14】 請求項1～5のいずれか1項に記載のポリペプチドまたは免疫学的断片に対して免疫特異的な抗体。

【請求項15】 ナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)に感染した疑いのある動物由来の生物学的サンプル中に存在する、請求項1～5のいずれか1項に記載のポリペプチドまたは該ポリペプチドに対して免疫特異的な抗体を同定することを含む、ナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)感染の診断方法。

【請求項16】 動物において免疫応答を生起させるのに使用する薬剤の調製における、免疫学的に有効な量の請求項1～5のいずれか1項に記載のポリペプチドを含む組成物の使用。

【請求項17】 動物において免疫応答を生起させるのに使用する薬剤の調製における、免疫学的に有効な量の請求項6～8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含む組成物の使用。

【請求項18】 請求項1～5のいずれか1項に記載のポリペプチドに対する少なくとも1種の抗体および適当な製薬学的担体を含む、ナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)感染症に罹患したヒトの治療に有用な治療用組成物。

【発明の詳細な説明】**【0001】****発明の分野**

本発明は、ポリヌクレオチド(本明細書中で「BASB059ポリヌクレオチド」と呼ぶ)、それによりコードされるポリペプチド(本明細書中で「BASB059」または「BASB059ポリペプチド」と呼ぶ)、組換え物質およびその生産方法に関する。別の態様において、本発明は、細菌感染に対するワクチンを含む、前記ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの使用方法に関する。更なる態様では、本発明は特定の病原体の感染を検出するための診断アッセイに関する。

【0002】**発明の背景**

ナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)(髄膜炎菌)はヒト上気道から頻繁に単離されるグラム陰性細菌である。この細菌は、時折、菌血症や髄膜炎等の侵入性細菌性疾患を引き起こす。髄膜炎菌性疾患の発生数には、地理的、季節的および年次的な差異が見られる(Schwartz,B., Moore,P.S., Broome, C.V.;*Clin.Microbiol.Rev.*2(Supplement), S18-S24,1989)。温暖な国々で最も多い疾患はB血清群株によるものであって、その発生数は1~10/100,000/年・総人口の間で変動し、しばしばより高値に達する(Kaczmarek,E.B.(1997), *Commun.Dis.Rep.Rev.*7:R55-9,1995;Scholten,R.J.P.M., Bijlmer, H.A., Poolman,J.T.ら、*Clin.Infect.Dis.* 16:237-246, 1993;Cruz,C., Pavez,G., Aguilar,E.,ら、*Epidemiol.Infect.*105:119-126,1990)。

【0003】

A血清群の髄膜炎菌が優位を占める流行は、その大部分が中央アフリカで発生し、しばしば1000/100,000/年のレベルにまで達する(Schwartz,B., Moore,P.S., Broome, C.V. *Clin.Microbiol.Rev.*2(Supplement), S18-S24,1989)。髄膜炎菌性疾患全体からみて殆ど全ての症例がA、B、C、W-135およびYの血清群の髄膜炎菌により引き起こされ、4価のA、C、W-135、Y多糖ワクチンが利用可能である(Armand,J., Arminjon,F., Mynard,M.C., Lafaix,C., *J.Biol.Stand.* 10:335-339,1982)。

【0004】

前記多糖ワクチンは、それらをキャリアタンパク質に化学的に結合することにより現在も改良が行われている(Lieberman, J.M., Chiu, S.S., Wong, V.K.ら、JAMA 275:1499-1503, 1996)。

【0005】

B血清群のワクチンは利用できない。何故なら、おそらくはこのBの被膜多糖が宿主成分との構造類似性を有しているために、該多糖が免疫原性をもたないことが見出されたからである(Wyle, F.A., Artenstein, M.S., Brandt, M.L.ら、J. Infect. Dis. 126:514-522, 1972; Finne, J.M., Leinonen, M., Makela, P.M. Lancet ii .:355-357, 1983)。

【0006】

長年にわたり、髄膜炎菌の外膜をベースとしたワクチンを開発するための試みが開始され、行われてきた(de Moraes, J.C., Perkins, B., Camargo, M.C.ら、Lancet 340:1074-1078, 1992; Bjune, G., Hoiby, E.A. Gronnesby, J.K.ら、338:1093-1096, 1991)。そのようなワクチンは年長の児童(4歳より上)および青年男女で57%~85%の効果を示す。

【0007】

多くの細菌の外膜成分(例えば、PorA、PorB、Rmp、Opc、Opa、FrpB)がこれらのワクチン中に存在しており、これらの成分の観察された防御への寄与については依然として更なる定義付けが必要である。他の細菌の外膜成分は、動物またはヒトの抗体を用いることにより防御免疫の誘導に潜在的に関連すると定義付けられており、例えばTbpBおよびNspAがある(Martin, D., Cadieux, N., Hamel, J., Brodeux, B.R., J. Exp. Med. 185:1173-1183, 1997; Lissolo, L., Maitre-Wilmotte, C., Dumas, p.ら、Inf. Immun. 63:884-890, 1995)。防御免疫機構は、抗体媒介性の殺菌活性およびオプソニン性食菌作用(opsonophagocytosis)と関係がある。

【0008】

菌血症動物モデルを使用することで、全ての抗体媒介性機構が結びつけられた(Saukkonen, K., Leinonen, M., Abdillahi, H. Poolman, J.T. Vaccine 7:325-328, 1989)。後期補体成分媒介性の殺菌機構が髄膜炎菌性疾患に対する免疫にとって

重要であることは一般に認められている(Ross,S.C., Rosenthal P.J., Berberic ,H.M., Densen,P.J.Infect.Dis. 155:1266-1275, 1987)。

【0009】

ナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)の感染頻度は過去数十年の間に劇的に上昇している。これは、複数の抗生物質に耐性な株の出現および免疫系が弱められた人口数の増大を原因とする。幾つかのまたは全ての標準的な抗生物質に耐性であるナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)株が単離されることは、もはや珍しいことではない。この現象は、新たな抗菌剤、ワクチン、薬剤のスクリーニング法、およびこれらの生物用の診断試験に対する、今までに経験したことの無い医薬の要求および需要を生み出した。

【0010】

発明の概要

本発明は、BASB059、特にBASB059ポリペプチドおよびBASB059ポリヌクレオチド、組換え物質およびその生産方法に関する。別の態様において、本発明は、特に微生物性疾患の予防および治療を含む、前記ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの使用方法に関する。更なる態様では、本発明は、微生物感染に関連する疾患およびかかる感染に関連する症状を検出するための診断アッセイ、例えば、BASB059ポリヌクレオチドもしくはポリペプチドの発現または活性を検出するためのアッセイに関する。

【0011】

開示された発明の精神および範囲内での種々の変更および変形は、後述の説明を読むことにより、また本開示内容の他の部分を読むことにより、当業者には容易に明らかとなる。

【0012】

発明の説明

本発明は、以下により詳細に記載するように、BASB059ポリペプチドおよびポリヌクレオチドに関する。特に、本発明は、ナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)のBASB059ポリペプチドおよびポリヌクレオチドに関する。該ポリペプチドは、いずれの既知のタンパク質とも何ら有意な類似性を示さない

。本発明は特に、それぞれ配列番号1および配列番号2に示すヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を有するBASB059に関する。後述の配列表に「DNA」として列挙した配列は、当業者であればかかる配列を一般にリボポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに有効に使用し得ることが理解されることから、本発明の1実施形態の例示にすぎないことが理解されよう。

【0013】

ポリペプチド

本発明の1態様において、本明細書中で「BASB059」および「BASB059ポリペプチド」と呼ぶナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)のポリペプチド、そして生物学上、診断上、予防上、臨床上または治療上有用なその変異体、ならびにそれらを含む組成物が提供される。

【0014】

さらに、本発明は、

(a) 配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも85%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらにより好ましくは少なくとも95%の同一性、最も好ましくは少なくとも97~99%の同一性を示すかまたは完全に同一であるアミノ酸配列を含んでなる単離されたポリペプチド、

(b) 配列番号1の全長にわたる配列番号1のポリヌクレオチド配列に対して、少なくとも85%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらにより好ましくは少なくとも95%の同一性、より一層好ましくは少なくとも97~99%の同一性を有するかまたは完全に同一であるポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、

(c) 配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも85%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらにより好ましくは少なくとも95%の同一性、より一層好ましくは少なくとも97~99%の同一性を有するかまたは完全に同一であるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、
を提供する。

【0015】

配列番号2に示すBASB059ポリペプチドは、ナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)のATCC13090株から得たBASB059ポリペプチドである。

【0016】

また本発明は、BASB059ポリペプチドの免疫原性断片、すなわち配列番号2のアミノ酸配列を含むBASB059ポリペプチドと同一または実質的に同一の免疫原活性を有する該ポリペプチドの連続した部分を提供する。すなわち、前記断片(必要であれば、担体に結合されている)は、BASB059ポリペプチドを認識する免疫応答を引き出すことができる。こうした免疫原性断片には、例えば、N末端のリーダー配列、および/または膜貫通ドメインおよび/またはC末端のアンカードメインを欠くBASB059ポリペプチドが含まれる。好ましい態様において、本発明のBASB059の免疫原性断片は、配列番号2の全長にわたる配列番号2のポリペプチド配列に対して少なくとも85%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらにより好ましくは少なくとも95%の同一性、最も好ましくは少なくとも97~99%の同一性を有するポリペプチドの実質的に全ての細胞外ドメインを含む。

【0017】

断片は、本発明の任意のポリペプチドの任意のアミノ酸配列と部分的には完全に同一であるが全てが同一ではないアミノ酸配列を有するポリペプチドである。BASB059ポリペプチドに関して言えば、断片は「フリースタンディング」であってもよいし、または該断片がその部分または領域を形成するより大きなポリペプチド中に、最も好ましくは単一のより大きなポリペプチド中の単一の連続した領域として含まれていてもよい。

【0018】

好ましい断片は、例えば、配列番号2のアミノ酸配列またはその変異体の部分(例えば、アミノ末端および/もしくはカルボキシ末端アミノ酸配列を含む連続した一連の残基)を有するトランケーションポリペプチドを含む。宿主細胞により、または宿主細胞内で生産される本発明のポリペプチドの分解形態も好ましい。さらに好ましいのは、ヘリックスおよびヘリックス形成領域、シートおよびシート形成領域、ターンおよびターン形成領域、コイルおよびコイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、両親媒性領域、両親媒性領域、フレキシブル

領域、表面形成領域、基質結合領域、および高抗原性指数(high antigenic index)領域を含む断片などの、構造的および機能的特性により特徴付けられる断片である。

【0019】

さらに好ましい断片には、配列番号2のアミノ酸配列に由来する少なくとも15、20、30、40、50もしくは100個の連続したアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド、または配列番号2のアミノ酸配列から末端が切断されたもしくは欠失した少なくとも15、20、30、40、50もしくは100個の連続したアミノ酸のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド、を含む。

【0020】

本発明のポリペプチドの断片を使用して、ペプチド合成により対応する全長ポリペプチドを生産することができる。従って、これらの断片を中間体として使用して、本発明の全長ポリペプチドを生産することができる。

【0021】

特に、数個、5~10個、1~5個、1~3個、1~2個または1個のアミノ酸が任意の組合せで置換、欠失または付加されている変異体が好ましい。

【0022】

本発明のポリペプチドまたは免疫原性断片は「成熟」タンパク質の形であっても、前駆体または融合タンパク質等のより大きいタンパク質の一部であってもよい。しばしば、追加のアミノ酸配列を含めることが有利であり、このようなアミノ酸配列には、分泌またはリーダー配列、プロ配列、多重ヒスチジン残基のような精製に役立つ配列、または組換え体生産の間の安定性を確保する付加的配列が含まれる。さらに、外来ポリペプチドまたは脂質テイル(lipid tail)またはポリヌクレオチド配列の追加により最終的な分子の免疫原としての可能性を高めることも考慮される。

【0023】

1つの態様において、本発明は、本発明のポリペプチドまたはその断片と、各種サブクラス(IgG、IgM、IgA、IgE)の免疫グロブリンのH鎖またはL鎖の定常領域の様々な部分と、を含んでなる遺伝子工学的に作製された可溶性融合タンパ

ク質に関する。免疫グロブリンとしてはヒトIgG、特にIgG1のH鎖の定常部が好ましく、その場合は融合がヒンジ領域で起こる。特定例では、血液凝固Xa因子で切断され得る切断配列を組み込むことで、Fc部分を簡単に除去できる。

【0024】

さらに、本発明は、これら融合タンパク質の遺伝子工学的作製方法、ならびに薬物スクリーニング、診断および治療におけるそれらの使用に関する。また、本発明の更なる態様はこのような融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドに関する。融合タンパク質技術の例は国際特許出願 W094/29458 およびW094/22914に見いだせる。

【0025】

前記タンパク質を化学的に結合するかまたは組換え融合タンパク質として発現させることにより、発現系において該タンパク質が非融合タンパク質に比べて増大されたレベルで産生される。融合パートナーはTヘルパーエピトープ、好ましくはヒトにより認識されるTヘルパーエピトープの提供を助ける(免疫学的融合パートナー)か、または前記タンパク質の、元の組換えタンパク質より高い産生量での発現を助ける(発現エンハンサー)ことができる。好ましくは、前記融合パートナーは免疫学的融合パートナーおよび発現エンハンサーパートナーの両方である。

【0026】

融合パートナーには、ヘモフィルス・インフルエンザ(*Haemophilus influenzae*)由来のプロテインDおよびインフルエンザウイルス由来の非構造タンパク質NS1(赤血球凝集素)が含まれる。別の融合パートナーはLytAとして知られるタンパク質である。好ましくは、該分子のC末端部分を使用する。LytAは、N-アセチル-L-アラニンアミダーゼであるアミダーゼLytA(LytA遺伝子によりコードされる[Gene. 43(1986) page 265-272])、すなわちペプチドグリカン骨格内の特定の結合を特異的に分解する自己分解酵素を合成するストレプトコッカス・ニューモーニア(*Streptococcus pneumoniae*)から得られる。前記LytAタンパク質のC末端ドメインは、コリン、またはDEAE等の数種のコリン類似体に対する親和性に関与している。この性質を融合タンパク質の発現に有用な大腸菌(*E. coli*)C-LytA発現プラ

スミドの開発に利用した。そのアミノ末端に前記C-LytA断片を含有するハイブリッドタンパク質の精製については、Biotechnology:10. (1992) page 795-798に記載されている。前記LytA分子のC末端に見出され、残基178から始まる反復部分(例えば残基188~305)を使用することができる。

【0027】

また、前記ポリペプチドの変異体、すなわち保存的アミノ酸置換(ある残基が性質の似ている他の残基により置換される)により基準ポリペプチドと相違しているポリペプチドも本発明に含まれる。典型的なこうした置換は、Ala, Val, Leu および Ileの間; Ser とThr の間; 酸性残基 AspとGlu の間; Asn とGln の間; 塩基性残基 LysとArg の間; または芳香族残基 PheとTyr の間で起こる。

【0028】

本発明のポリペプチドは任意の適当な方法で生産することができる。このようなポリペプチドには、単離された天然のポリペプチド、組換え的に生産されたポリペプチド、合成的に生産されたポリペプチド、またはこれらの方法の組合せにより生産されたポリペプチドが含まれる。こうしたポリペプチドを生産するための手段は当技術分野でよく理解されている。

【0029】

本発明のポリペプチドはナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)由来であることが最も好ましいが、好ましくは同じ分類学上の属に含まれるその他の生物から得ることができる。また、本発明のポリペプチドは、例えば同じ分類学上の科または綱の生物から得ることもできる。

【0030】

ポリヌクレオチド

本発明の目的は、BASB059ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、特に本明細書中でBASB059と呼ぶポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供することにある。

【0031】

本発明の特に好ましい実施形態では、前記ポリヌクレオチドは、配列番号1に示した配列を含むBASB059ポリペプチドをコードする領域を含み、これには全長

遺伝子またはその変異体が含まれる。

【0032】

配列番号1で示されるBASB059ポリヌクレオチドは、ナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)のATCC13090株に由来するBASB059ポリヌクレオチドである。

【0033】

本発明の更なる態様では、BASB059ポリペプチドおよびポリヌクレオチド、特にナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)のBASB059ポリペプチドおよびポリヌクレオチドをコードする、ならびに/または発現する単離された核酸分子が提供され、これには例えば、プロセッシングされていないRNA、リボザイムRNA、mRNA、cDNA、ゲノムDNA、B-およびZ-DNAが含まれる。本発明の更なる実施形態には、生物学上、診断上、予防上、臨床上または治療上有用なポリヌクレオチドおよびポリペプチド、およびその変異体、ならびにそれらを含む組成物が含まれる。

【0034】

本発明の別の態様は、配列番号2の推定アミノ酸配列を有するBASB059ポリペプチドをコードする、少なくとも1つの全長遺伝子を含む単離されたポリヌクレオチド、および該ポリヌクレオチドと密接に関連するポリヌクレオチドならびにその変異体に関する。

【0035】

本発明の別の特に好ましい実施形態としては、配列番号2のアミノ酸配列を含むかもしくは該配列からなるナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)由来のBASB059ポリペプチド、またはその変異体がある。

【0036】

本明細書中で提供される情報を用いると、配列番号1に示すポリヌクレオチド配列等の、BASB059ポリペプチドをコードする本発明のポリヌクレオチドは、標準的なクローニング法およびスクリーニング法、例えばナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)細胞を出発物質として用いて細菌から染色体DNA断片をクローニングおよび配列決定し、次いで全長クローンを得る方法等により

得ることができる。例えば、配列番号1に示すポリヌクレオチド配列等の本発明のポリヌクレオチド配列を得るためには、典型的には大腸菌またはある他の適当な宿主内のナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)の染色体DNAクローンのライブラリーを、放射性標識したオリゴヌクレオチド、好ましくは部分配列由来の17mer以上の長さのものでプローブする。その後、該プローブのDNAと同一のDNAを担持するクローンを、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件を用いて識別することができる。従って、ハイブリダイゼーションにより同定された個々のクローンを、元のポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列から設計した配列決定用プライマーを用いて配列決定することにより、その後ポリヌクレオチド配列を両方向に伸長して全長遺伝子配列を決定することが可能である。そうした配列決定は、例えばプラスミドクローンから調製した変性二本鎖DNAを用いて都合よく実施する。適当な技術はManiatis, T., Fritsch, E.F.およびSambrookら、MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 第2版; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York(1989)に記載されている(特にScreening By Hybridization 1.90 およびSequencing Denatured Double-Stranded DNA Templates 13.70を参照されたい)。また、直接ゲノムDNA配列決定を行って全長遺伝子配列を得ることもできる。本発明の具体例である配列番号1に示した各ポリヌクレオチドは、ナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)由来のDNAライブラリー中に見出された。

【0037】

さらに、配列番号1に示す各DNA配列は、当業者に周知のアミノ酸残基の分子量値を用いて算出しうる推定分子量を有する、配列番号2に示すおおよその数のアミノ酸残基を有するタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含有する。

【0038】

配列番号1のポリヌクレオチド(配列番号1のヌクレオチド番号1の開始コドンとヌクレオチド番号337で始まる終結コドンとの間)は、配列番号2のポリペプチドをコードする。

【0039】

更なる態様において、本発明は、下記(a)または(b)のポリヌクレオチド配列を含む、または下記(a)または(b)のポリヌクレオチド配列からなる、単離されたポリヌクレオチドを提供する；

(a) 配列番号1のポリヌクレオチド配列に対して、配列番号1の全長にわたって少なくとも85%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらにより好ましくは少なくとも95%の同一性、より一層好ましくは少なくとも97~99%の同一性を有するかもしくは完全に同一であるポリヌクレオチド配列、または

(b) 配列番号2のアミノ酸配列に対して、配列番号2の全長にわたって少なくとも85%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらにより好ましくは少なくとも95%の同一性、より一層好ましくは少なくとも97~99%の同一性もしくは100%きっかりの同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列。

【0040】

ナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)以外の種に由来する相同体およびオーソログ体を含む本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号1の配列もしくはその断片からなるもしくはそれらを含む標識されたプローブまたは検出可能なプローブを用いて、ストリンジェントな条件下(例えば、45~65 の範囲の温度および0.1~1%のSDS濃度を用いて)適当なライブラリーをスクリーニングし、該ポリヌクレオチド配列を含む全長遺伝子および/またはゲノムクローンを単離する各工程を含んでなる方法により得られる。

【0041】

本発明は、配列番号1中のコード配列(オープンリーディングフレーム)に対して、その全長にわたり同一であるポリヌクレオチド配列を提供する。また、本発明により、成熟ポリペプチドもしくはその断片のコード配列単独、ならびに別のコード配列(例えば、リーダーまたは分泌配列、プレ-またはプロ-またはプレプロ-タンパク質配列をコードする配列)をそのリーディングフレーム内に有する成熟ポリペプチドもしくはその断片のコード配列が提供される。また、本発明のポリヌクレオチドは、例えば、限定するものではないが、少なくとも1つの5'および3'非コード配列、例えば、転写されるが翻訳されない配列、終結シグナル

(例えば、rho依存性およびrho非依存性終結シグナル)、リボソーム結合部位、コザック(Kozak)配列、mRNA安定化配列、イントロン、ならびにポリアデニル化シグナル、を含む少なくとも1つの非コード領域を含有していてもよい。また、このポリヌクレオチド配列は、追加のアミノ酸をコードする追加のコード配列を含んでいてもよい。例えば、融合ポリペプチドの精製を容易にするマーカー配列がコードされ得る。本発明の特定の実施形態では、マーカー配列は、pQEベクター(Qiagen, Inc.)により提供されかつ Gentzら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824(1989)に記載されるような、ヘキサ-ヒスチジンペプチド、またはHAペプチドタグ(Wilsonら、Cell 37:767(1984))であり、いずれもそれらに融合させたポリペプチド配列を精製する際に有用でありうる。また、本発明のポリヌクレオチドは、限定するものではないが、構造遺伝子および該遺伝子その自然状態において関連する遺伝子発現制御配列を含むポリヌクレオチドを含む。

【0042】

配列番号2のBASB059ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、配列番号1のヌクレオチド番号1~336中に含まれるポリペプチドコード配列と同一であってもよい。あるいは、遺伝子コードの重複性(縮重)のために、やはり配列番号2のポリペプチドをコードする配列であってもよい。

【0043】

本明細書中で使用する用語「ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド」は、本発明のポリペプチド、特に細菌のポリペプチド、より特定的には配列番号2に示すアミノ酸配列を有するナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)BASB059のポリペプチド、をコードする配列を含むポリヌクレオチドを包含する。また、この用語は、前記ポリペプチドをコードする単一の連続領域または不連続領域(例えば、組み込まれたファージ、組み込まれた挿入配列、組み込まれたベクター配列、組み込まれたトランスポゾン配列により、またはRNAエディティングもしくはゲノムDNA再構成により分断されたポリヌクレオチド)を、やはりコード配列および/または非コード配列を含有しうる追加の領域と共に含むポリヌクレオチドを包含する。

【0044】

本発明はさらに、配列番号2の推定アミノ酸配列を有するポリペプチドの変異体をコードする、本明細書中に記載されたポリヌクレオチドの変異体に関する。本発明のポリヌクレオチドの断片を使用して、例えば、本発明の全長ポリヌクレオチドを合成することができる。

【0045】

更にとりわけ好ましい実施形態としては、配列番号2のBASB059ポリペプチドのアミノ酸配列を有するBASB059変異体をコードするポリヌクレオチドであって、数個、少数個、5~10個、1~5個、1~3個、2個、1個、または0個のアミノ酸残基が任意の組合せで置換、修飾、欠失および/または付加されているポリヌクレオチドがある。これらのうち特に好ましいのは、BASB059ポリペプチドの特性および活性を変更しないサイレント置換、付加および欠失である。

【0046】

本発明の更に好ましい実施形態としては、配列番号2に示すアミノ酸配列を有するBASB059ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに対して、その全長にわたり、少なくとも85%の同一性を有するポリヌクレオチド、ならびにかかるポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドがある。これに関して、配列番号2に示すアミノ酸配列を有するBASB059ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに対して、その全長にわたり、少なくとも90%の同一性を有するポリヌクレオチドが特に好ましく、これらの特に好ましいポリヌクレオチドのうち少なくとも95%の同一性を有するものがとりわけ好ましい。更に、少なくとも95%の同一性を有するポリヌクレオチドのうち少なくとも97%の同一性を有するものが一層好ましく、これらのうち少なくとも98%および少なくとも99%の同一性を有するものが特に一層好ましく、少なくとも99%の同一性を有するものが最も好ましいものである。

【0047】

好ましい実施形態としては、配列番号1のDNAによりコードされる成熟ポリペプチドと実質的に同一の生物学的機能または活性を保持しているポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドがある。

【0048】

本発明の特定の好ましい実施形態に従って、特にストリンジェントな条件下で、配列番号1のポリヌクレオチド等のBASB059ポリヌクレオチド配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドが提供される。

【0049】

更に、本発明は、本明細書中で提供されるポリヌクレオチド配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。これに関して、本発明は特に、ストリンジェントな条件下で本明細書中に記載のポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。本明細書中で使用する場合、用語「ストリンジェントな条件」および「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」とは、配列間に少なくとも95%の同一性、および好ましくは少なくとも97%の同一性がある場合にのみハイブリダイゼーションが生じることを意味する。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の特定の具体例は、50% ホルムアミド、5×SSC (150mM NaCl, 15mM クエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム (pH7.6)、5×Denhardt溶液、10% デキストラン硫酸および20 μg/mlの変性し切断したサケ精子DNAを含有する溶液中42 で一夜インキュベートし、次いでハイブリダイゼーション支持体を 0.1×SSC 中約65 で洗浄することである。ハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件は周知であり、Sambrookら、Molecular Cloning:A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989)中、特に第11章に例示されている。また、溶液ハイブリダイゼーションを、本発明により提供されるポリヌクレオチド配列と共に使用することができる。

【0050】

また、本発明は、配列番号1に示すポリヌクレオチド配列またはその断片の配列を有するプローブを用いて、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で完全な前記遺伝子を含有する適当なライブラリーを配列番号1に示すポリヌクレオチド配列についてスクリーニングし、前記ポリヌクレオチド配列を単離することにより得られるポリヌクレオチド配列からなる、または該ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。かかるポリヌクレオチドを得るために有用な断片には、例えば、本明細書中の他の箇所において十分に記載したプローブおよびプライマーが含まれる。

【0051】

本発明のポリヌクレオチドアッセイに関して本明細書中の他の箇所において論じたように、例えば、本発明のポリヌクレオチドをRNA、cDNAおよびゲノムDNAに対するハイブリダイゼーションプローブとして使用して、BASB059をコードする完全長cDNAおよびゲノムクローンを単離、または、BASB059遺伝子に対して高い同一性、特に高い配列同一性を有する別の遺伝子のcDNAおよびゲノムクローンを単離することができる。このようなプローブはたいてい少なくとも15個のヌクレオチド残基または塩基対を含む。好ましくは、このようなプローブは少なくとも30個のヌクレオチド残基または塩基対を有し、少なくとも50個のヌクレオチド残基または塩基対を有していてもよい。特に好ましいプローブは少なくとも20個のヌクレオチド残基または塩基対を有し、かつ30個未満のヌクレオチド残基または塩基対を有するものである。

【0052】

BASB059遺伝子のコード領域を配列番号1に示すDNA配列を用いてスクリーニングすることにより単離し、オリゴヌクレオチドプローブを合成することができる。次いで、本発明の遺伝子の配列に相補的な配列を有する標識オリゴヌクレオチドを使用してcDNA、ゲノムDNAまたはmRNAのライブラリーをスクリーニングし、該ライブラリーのどのメンバーに前記プローブがハイブリダイズするかを決定することができる。

【0053】

完全長DNAを得るための、または短鎖DNAを伸長させるための、当業者に周知で利用可能な方法がいくつかあり、例えば、cDNA末端高速増幅法(RACE)に基づいた方法がある(例えば、Frohmanら、PNAS USA 85, 8998-9002, 1988を参照のこと)。例えばMarathon™技術(Clontech Laboratories Inc.)により例示されるような、上記技法の最近の改良により、より長いcDNAの検索が大いに簡便化された。Marathon™技術では、所定の組織より抽出されたmRNAからcDNAを作製し、各末端に「アダプター」配列を連結する。続いて、遺伝子特異的およびアダプター特異的なオリゴヌクレオチドプライマーの組合せを用いて核酸増幅(PCR)を行い、前記DNAの「欠失」5'末端を増幅する。次に、「ネステッド(nested)」プライ

マー、すなわち増幅産物の内部にアニーリングするように設計されたプライマー（典型的には、アダプター配列のさらに3'側にアニーリングするアダプター特異的プライマーおよび選択された遺伝子配列のさらに5'側にアニーリングする遺伝子特異的プライマー）を用いてPCR反応を繰り返す。その後、この反応の産物をDNA塩基配列決定により解析し、この産物を既存のDNAに直接結合して完全な配列とするか、または5'プライマー設計用の新たな配列情報を用いて別の全長PCRを行うことにより、全長DNAを構築することができる。

【0054】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドを、本明細書中でポリヌクレオチドアッセイについて更に論じたように、例えば、疾患(特にヒトの疾患)用の治療薬および診断薬を発見するための、研究試薬ならびに材料として使用することができる。

【0055】

配列番号1または2の配列に由来するオリゴヌクレオチドである本発明のポリヌクレオチドを本明細書中に記載した方法、好ましくはPCRにおいて使用して、本発明で同定されたポリヌクレオチドの全体または一部分が感染組織中の細菌にて転写されるか否かを確認することができる。また、病原体が到達した感染段階および感染型を診断する際にそのような配列が有用であることは理解されよう。

【0056】

また、本発明は、成熟タンパク質に追加のアミノもしくはカルボキシ末端アミノ酸を、または(例えば、成熟形態が2以上のポリペプチド鎖を有する場合は)該成熟タンパク質内部に追加のアミノ酸を付け加えたポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。そのような配列は、タンパク質を前駆体から成熟形態にプロセッシングする際に何らかの役割を果たし、タンパク質の輸送を可能とし、タンパク質の半減期を延長するかまたは短縮し、あるいは特にアッセイまたは生産のためのタンパク質の操作を容易にすることができる。in vivoの場合は一般に、前記の追加のアミノ酸を細胞内酵素により前記成熟タンパク質から除去することができる。

【0057】

本発明の各々のポリヌクレオチドについても、それに相補的なポリヌクレオチドが提供される。これらの相補的なポリヌクレオチドは、それらが相補性を示す各ポリヌクレオチドに対して十分に相補的であることが好ましい。

【0058】

前駆体タンパク質は、そのポリペプチドの成熟形態が1以上のプロ配列に融合されている場合、該ポリペプチドの不活性形態であってもよい。プロ配列が除去されると、通常そのような不活性前駆体は活性化される。前記プロ配列のいくつかまたは全ては、活性化の前に除去され得る。一般に、そのような前駆体はプロタンパク質と呼ばれる。

【0059】

ヌクレオチドを示す標準的な記号A、G、C、T/Uに加えて、用語「N」を本発明の特定のポリヌクレオチドを記載する際に使用することもできる。「N」は4種のDNAまたはRNAヌクレオチドのうちの任意のものが、DNAまたはRNA配列中のその示された位置にみられることを意味する。ただし、隣接するヌクレオチド位置と組み合わせて用いられる場合や正しいリーディングフレームで読まれる場合には、Nはそのようなリーディングフレーム内に早期終結コドンを生じる効果を有する核酸ではないことが好ましい。

【0060】

まとめると、本発明のポリヌクレオチドは成熟タンパク質、成熟タンパク質にリーダー配列を付け加えたもの(プレタンパク質とも呼ばれる)、プレタンパク質のリーダー配列ではない1以上のプロ配列を有する成熟タンパク質の前駆体、またはプレプロタンパク質(通常はポリペプチドの活性形態および成熟形態を生産するプロセッシング工程の間に除去される1以上のプロ配列、およびリーダー配列を有する、プロタンパク質の前駆体)をコードするものであってよい。

【0061】

本発明の態様に従うと、本発明のポリヌクレオチドの治療または予防目的での使用、特に遺伝学的免疫感作(genetic immunization)における使用が提供される。

。

【0062】

遺伝学的免疫感作における本発明のポリヌクレオチドの使用では、好ましくは、プラスミドDNAの筋内への直接注射(Wolffら、Hum Mol Genet(1992)1:363, Manthorpeら、Hum. Gene Ther.(1983)4:419)、特定のタンパク質担体と複合体化させたDNAの送達(Wuら、J Biol Chem.(1989)264:16985)、DNAとリン酸カルシウムとの共沈殿(BenvenistyおよびReshef, PNAS USA, (1986)83:9551)、DNAの種々の形態のリポソームへの封入(Kanedaら、Science(1989)243:375)、粒子銃(Tangら、Nature(1992)356:152, Eisenbraunら、DNA Cell Biol(1993)12:791)ならびにクローン化レトロウイルスベクターを用いたin vivo感染(Seegerら、PNAS USA(1984)81:5849)等の適切な送達方法を使用する。

【0063】

ベクター、宿主細胞、発現系

本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含むベクター、本発明の該ベクターにより遺伝子操作された宿主細胞ならびに組換え法による本発明のポリペプチドの生産に関する。本発明のDNA構築物から誘導されたRNAを用いてこの種のタンパク質を生産するために、無細胞翻訳系を使用することもできる。

【0064】

本発明の組換えポリペプチドは、当業者に周知の手法により、発現系を含む遺伝子操作された宿主細胞から調製することができる。従って、更なる態様において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含む発現系、かかる発現系を用いて遺伝子操作された宿主細胞、ならびに組換え法による本発明のポリペプチドの生産に関する。

【0065】

本発明のポリペプチドの組換え生産のために、宿主細胞を遺伝子操作して発現系もしくはその部分または本発明のポリヌクレオチドを組み込むことができる。ポリヌクレオチドの宿主細胞への導入は、例えば、Davisら、BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1986) および Sambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) などの多くの標準的な実験室マニュアルに記載された方法、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE - デキストラン媒介トラ

ンスフェクション、トランスベクション(transvection)、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレープローディング(scrape loading)、弾丸導入(ballistic introduction)および感染などによって行うことができる。

【0066】

適当な宿主の代表的な例として、細菌細胞(例:ストレプトコッカス、スタフィロコッカス、エンテロコッカス、大腸菌、ストレプトミセス、シアノバクテリア、枯草菌、モラクセラ・カタラリス(*Moraxella catarrhalis*)、ヘモフィルス・インフルエンザ(*Haemophilus influenzae*)およびナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*))、真菌細胞(例:酵母であるクルベロミセス(*Kluyveromyces*)、サッカロミセス、また担子菌、カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)およびアスペルギルス)、昆虫細胞(例:ショウジョウバエS2、スポドプテラSf9)、動物細胞(例:CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、293、CV-1およびBowesメラノーマ細胞)および植物細胞(例:裸子植物または被子植物の細胞)が挙げられる。

【0067】

多種多様な発現系を使用して、本発明のポリペプチドを生産することができる。そのようなベクターとして、特に、染色体、エピソームおよびウイルス由来のベクター、例えば、細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来、酵母エピソーム由来、挿入因子由来、酵母染色体エレメント由来、ウイルス(例:バキュロウイルス、SV40のようなパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、ピコルナウイルス、レトロウイルスおよびアルファウイルス)由来のベクター、ならびにこれらの組合せに由来するベクター、例えばコスミドやファージミドのようなプラスミドとバクテリオファージの遺伝的要素に由来するものがある。発現系構築物は発現を調節するだけでなく発現を起こさせる制御領域を含んでいてもよい。一般的に、宿主内でポリヌクレオチドを維持し、増やすかもしくは発現するのに適した系もしくはベクター、および/またはポリペプチドを発現するのに適した系もしくはベクターはどれもこの点に関して発現のために使用しうる。例えば、Sambrook

ら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (前掲)に記載されるような、周知で日常的に用いられる種々の技法のいずれかにより、適当なDNA配列を発現系に挿入することができる。

【0068】

真核細胞における組み換え発現系の場合、翻訳されたタンパク質を小胞体の内腔に、細胞周辺腔に、または細胞外の環境に分泌させるために、適当な分泌シグナルを発現されるポリペプチドに組み込むことができる。これらのシグナルは該ポリペプチドに対して内因性であっても、異種シグナルであってもよい。

【0069】

組換え細胞培養物から本発明のポリペプチドを回収し精製するには、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた周知の方法を用いることができる。最も好ましくは、イオン金属アフィニティークロマトグラフィー(ion metal affinity chromatography: IMAC)が精製に用いられる。ポリペプチドが細胞内合成、単離および/または精製中に変性されるときは、タンパク質を再生させるための周知の技法を用いて、活性のある立体構造を復元することが可能である。

【0070】

また、前記発現系はウイルスまたは細菌等の組換え生存微生物であってもよい。目的とする遺伝子を組換え生存ウイルスまたは細菌のゲノム内に挿入することができる。この生存ベクターを用いての接種またはin vivo感染により、抗原のin vivo発現および免疫応答の誘導がもたらされる。この目的のために使用するウイルスおよび細菌としては、例えば、ポックスウイルス(例えば、ワクシニアウイルス、鶏痘ウイルス、カナリア痘ウイルス)、アルファウイルス(シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス、ヴェネズエラウマ脳炎ウイルス)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ピコルナウイルス(ポリオウイルス、ライノウイルス)、ヘルペスウイルス(水痘-帯状ヘルペスウイルス等)、リステリア、サルモネ

ラ、シゲラ、ナイセリア、BCG、がある。これらのウイルスおよび細菌は有毒であっても、または生ワクチンを得るために種々の方法により弱毒化されていてもよい。そのような生ワクチンもまた、本発明の一部を成すものである。

【0071】

診断アッセイ、予後判定アッセイ、血清型判別(serotyping)アッセイおよび変異アッセイ

また、本発明は、本発明のBASB059ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの診断用試薬としての使用に関する。真核生物(特に哺乳動物、とりわけヒト)におけるBASB059ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドの検出により、疾患、疾患の段階または薬剤に対する感染生物の応答を診断するための診断方法が提供される。真核生物(特に哺乳動物、とりわけヒト、特にBASB059遺伝子もしくはタンパク質を含む生物に感染した、または感染した可能性のあるヒト)を、種々の周知の技法および本明細書中で示す方法により核酸レベルまたはアミノ酸レベルで検出することができる。

【0072】

予後、診断または他の分析用のポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、感染したと思われる個体および/または感染した個体の生体材料から得ることができる。これらのいずれかの供給源に由来するポリヌクレオチド、特にDNAまたはRNAを検出のために直接使用してもよいし、分析前にPCRまたは他の増幅法を使って酵素的に増幅してもよい。また、RNA(特にmRNA)、cDNAおよびゲノムDNAを同様の方法で使用することもできる。増幅を用いて、個体に存在する感染生物または常在生物の種および系統を、該生物の選択したポリヌクレオチドの遺伝子型の分析により特徴付けることができる。欠失および挿入は、近縁の生物(好ましくは同じ属で異なる種の生物または同じ種で異なる系統の生物)から選択された基準配列の遺伝子型と比較したときの増幅産物のサイズの変化により検出できる。点突然変異は増幅DNAを標識したBASB059ポリヌクレオチド配列とハイブリダイズさせることで同定できる。完全にもしくは有意にマッチした配列と、不完全にもしくはより有意にミスマッチである二重鎖とは、DNAまたはRNAそれぞれについて、DNアーゼまたはRNアーゼ消化により、または融解温度もしくは再生キネティクスの

差を検出することにより区別できる。また、ポリヌクレオチド配列の差異は、基準配列と比較した場合のゲルでのポリヌクレオチド断片の電気泳動の移動度の変化により検出できる。これは変性剤を用いても用いなくても実施できる。また、ポリヌクレオチドの差異は、直接DNAまたはRNA塩基配列決定によっても検出できる（例えば、Myersら、Science 230:1242(1985)を参照のこと）。特定位置での配列変化はヌクレアーゼプロテクションアッセイ（例えば、RNアーゼ、V1およびS1プロテクションアッセイ）または化学的開裂法によっても確認できる（Cottonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4397-4401(1985)を参照のこと）。

【0073】

別の実施形態において、BASB059ヌクレオチド配列またはその断片を含むオリゴヌクレオチドプローブのアレイを構築して、例えば、遺伝的突然変異、血清型、分類学的な分類または同定の効率的なスクリーニングを実施することができる。アレイ技法は周知であって一般に適用可能であり、これを使用して遺伝子発現、遺伝的連鎖、および遺伝的多様性を含む分子遺伝学における様々な疑問に取り組むことができる（例えば、Cheeら、Science, 274:610 (1996)を参照のこと）。

【0074】

かくして、別の態様において、本発明は、

- (a) 本発明のポリヌクレオチド、好ましくは配列番号1のヌクレオチド配列、もしくはその断片、
 - (b) (a)のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、
 - (c) 本発明のポリペプチド、好ましくは配列番号2のポリペプチド、もしくはその断片、または
 - (d) 本発明のポリペプチド、好ましくは配列番号2のポリペプチド、に対する抗体、
- を含む、診断用キットに関する。

【0075】

このようなキットにおいて、(a)、(b)、(c)または(d)が実質的な構成成分であることが理解されよう。このようなキットは疾患または疾患への罹りやすさなど

を診断するうえで有用である。

【0076】

本発明はまた、診断薬としての本発明のポリヌクレオチドの使用に関する。疾病または病原性と関連した、本発明のポリヌクレオチド、好ましくは配列番号1のポリヌクレオチドの変異型の検出は、該ポリヌクレオチドの過少発現、過剰発現または改変した発現により生ずる疾病、疾病の進行の予後、疾病のステージの決定、またはその疾病への罹りやすさの診断に追加しうる、またはその診断を下しうる診断用ツールを提供するだろう。該ポリヌクレオチド中に突然変異を有する生物、特に感染症の生物を、本明細書の他に記載されているさまざまな技法によりポリヌクレオチドレベルで検出することができる。

【0077】

また本発明のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドにおいて突然変異または多型性(対立遺伝子変異)を有する生物由来の細胞を、種々の技法によってポリヌクレオチドレベルまたはポリペプチドレベルで検出することができ、それにより例えば血清型を判別することができる。例えば、RT-PCRを使用して、RNAにおける突然変異を検出することができる。特に好ましくは、RT-PCRを、例えばGeneScanなどの自動検出システムと組み合わせて使用する。RNA、cDNAまたはゲノムDNAもまた同じ目的でPCRに使用することができる。例えば、BASB059ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに相補的なPCRプライマーを使用して、突然変異を同定し、解析することができる。

【0078】

更に本発明は、5'末端および/または3'末端から取り出した1、2、3または4個のヌクレオチドを有するプライマーを提供する。これらのプライマーは特に、生体材料などの個体由来のサンプルから単離したBASB059 DNAおよび/またはRNAを増幅するのに使用しうる。該プライマーを使用して感染した個体から単離されたポリヌクレオチドを増幅することができ、次いでそのポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド配列の解明のための種々の技法に付すことができる。このようにして、ポリヌクレオチド配列における突然変異を検出し、かつ使用して、感染症または該感染症のステージもしくは進行を診断および/または予後判定するか、あ

るいは該感染因子を血清を判別する、および/または分類することができる。

【0079】

本発明は更に、疾患、好ましくは細菌感染症、より好ましくはナイセリア・メニンギチジス (*Neisseria meningitidis*) により引き起こされる感染症を診断する方法を提供する。該方法には、生体材料などの個体由来のサンプルから、配列番号1の配列を有するポリヌクレオチドの発現レベルの上昇を測定することが含まれる。BASB059ポリヌクレオチドの発現の増加または低下は、当業界で公知のポリヌクレオチドの定量法、例えば増幅、PCR、RT-PCR、RNaseプロテクション、ノーザンブロッティング、分光測定法、その他のハイブリダイゼーション法などの方法のいずれか1つにより測定することができる。

【0080】

更に、正常な対照組織サンプルと比較した場合のBASB059ポリペプチドの過剰発現を検出するための本発明の診断アッセイを使用して、例えば感染症の有無を検出する。宿主から得られたサンプル中(生体材料など)のBASB059ポリペプチドのレベルを測定するのに使用しうるアッセイ法は当業者によく知られている。こうしたアッセイ法として、ラジオイムノアッセイ、競合結合アッセイ、ウエスタンブロット解析、抗体サンドイッチアッセイ、抗体検出、ELISAアッセイなどがある。

【0081】

本発明のポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドアレイ、好ましくは高密度アレイまたはグリッドの構成成分として使用することができる。これらの高密度アレイは、診断用途および予後判定の用途に特に有用である。例えば、それぞれが異なる遺伝子を含み、更に本発明のポリヌクレオチドを含むスポットの1セットを、生体サンプルから得たまたは生体サンプルから誘導したプローブを利用して、ハイブリダイゼーションまたは核酸増幅などにより、プロービングに使用することができる。それによって個体中の特定のポリヌクレオチド配列または関連配列の存在を決定することができる。そのような配列の存在は、病原体の存在、特にナイセリア・メニンギチジス (*Neisseria meningitidis*) の存在を示し得るものであり、疾患もしくは疾患の進行を診断および/または予後判定するのに有用で

ありうる。配列番号1のポリヌクレオチド配列のいくつかの変異体を含むグリッドが好ましい。また、配列番号2のポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列のいくつかの変異体を含むグリッドが好ましい。

【0082】

抗体

本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチド、もしくはそれらの変異体、またはそれらを発現する細胞は、該ポリペプチドまたはポリヌクレオチドにそれぞれ免疫特異的な抗体を製造するための免疫原として使用することができる。

【0083】

本発明の特定の好ましい実施形態において、BASB059ポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する抗体が提供される。

【0084】

本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対して生成された抗体は、慣用のプロトコルを用いて、動物（好ましくはヒト以外）に本発明のポリペプチドおよび/もしくはポリヌクレオチド、またはそのどちらかもしくは両方のエピトープ含有断片、どちらかもしくは両方の類似体、あるいはどちらかもしくは両方を発現する細胞を投与することにより得ることができる。モノクローナル抗体の調製には、連続細胞系の培養物により抗体を産生させる当技術分野で公知の任意の技法を用いることができる。例を挙げると、Kohler, G.およびMilstein, C.の方法（Nature 256:495-497(1975)）、Kozborらの方法（Immunology Today 4:72(1983)）およびColeらの方法（Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pg77-96, Alan R. Liss, Inc.(1985)）など種々の方法がある。

【0085】

本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する一本鎖抗体を産生するために、一本鎖抗体の調製法（米国特許第4,946,778号）も適用することができる。また、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに免疫特異的なヒト化抗体を発現させるために、トランスジェニックマウスまたは他の生物もしくは他の哺乳動物などの動物を利用することができる。

【0086】

あるいは、ファージディスプレイ法を利用して、抗BASB059の保持についてスクリーニングしたヒト由来のリンパ球のPCR増幅したv遺伝子のレパトリー、あるいは天然ライブラリー (McCaffertyら、(1990)Nature 348, 552-554 ; Marksら、(1992)Biotechnology 10, 779-783) のいずれかから、本発明のポリペプチドに対し結合活性を有する抗体遺伝子を選択することができる。これらの抗体の親和性を、例えば、チェーンシャuffling (chain shuffling : Clacksonら、(1991)Nature 352:628) により改良することもできる。

【0087】

前述の抗体を用いて、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを発現するクローンを単離または同定したり、例えばアフィニティークロマトグラフィーでそのポリペプチドまたはポリヌクレオチドを精製することもできる。

【0088】

従ってその中でも、BASB059ポリペプチドまたはBASB059ポリヌクレオチドに対する抗体を使用して、感染症、特に細菌感染症を治療する。

【0089】

ポリペプチド変異体には、抗原的に、エピトープ的にまたは免疫学的に本発明の特定の態様を形作る等価変異体が含まれる。

【0090】

好ましくは、前記抗体またはその変異体を改変し、個体におけるその免疫原性がより低くなるようにする。例えば、該個体がヒトである場合、該抗体は「ヒト化」されているのが最も好ましく、その際、ハイブリドーマ化された抗体の相補性決定領域は、例えばJonesら(1986)Nature 321, 522-525、またはTempestら(1991)Biotechnology 9, 266-273に記載のようにヒトモノクローナル抗体中に導入される。

【0091】

アンタゴニストおよびアゴニスト - アッセイおよび分子

また本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドを用いて、例えば、細胞、無細胞調製物、化学ライブラリーおよび天然産物混合物中の、小分子基質とリガンドとの結合を評価することができる。これらの基質およびリガンドは、天然基

質およびリガンドであってもよいし、または構造的もしくは機能的にミメティックであってもよい。例えば、Coliganら、Current Protocols in Immunology 1(2):5章(1991)を参照のこと。

【0092】

スクリーニング法では、本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチド、または該ポリペプチドもしくはポリヌクレオチドを担持する細胞もしくは膜、または該ポリペプチドの融合タンパク質、への候補化合物の結合を、該候補化合物に直接または間接的に結合される標識を用いて簡単に測定できる。あるいは、スクリーニング法では標識した競合物質との競合を用いることもある。さらに、こうしたスクリーニング法では、該候補化合物が該ポリペプチドもしくはポリヌクレオチドの活性化または抑制により生ずるシグナルを結果的にもたらすか否かを、該ポリペプチドもしくはポリヌクレオチドを含有する細胞に適した検出系を用いて試験することができる。一般的には、既知のアゴニストの存在下で活性化のインヒビターをアッセイして、アゴニストによる活性化に該候補化合物の存在が与える影響を観察する。アゴニストまたはインヒビターの不在下で、該候補化合物が該ポリペプチドもしくはポリヌクレオチドの活性化を抑制するか否かを調べることによる反アゴニストまたはインヒビターのスクリーニング法では、場合によっては、構成的に活性のあるポリペプチドならびに/または構成的に発現されるポリペプチドおよびポリヌクレオチドが用いられる。さらに、これらのスクリーニング法は、候補化合物と本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチドを含む溶液とを混ぜ合わせて混合物をつくり、この混合物中のBASB059ポリペプチドおよび/もしくはポリヌクレオチド活性を測定し、そしてこの混合物のBASB059ポリペプチドおよび/もしくはポリヌクレオチド活性をスタンダードと比較する各ステップを単に含む。本発明のポリペプチド、ならびに系統学的におよび/または機能的に関連するポリペプチドのアンタゴニストを同定するためのハイスループットスクリーニングアッセイでは、上記のようなFc部分とBASB059ポリペプチドから作製されるような融合タンパク質も使用することができる(D. Bennettら、J. Mol. Recognition, 852-58 (1995) およびK. Johansonら、J. Biol. Chem., 270(16):94599471 (1995)を参照のこと)。

【0093】

また、本発明のポリペプチドに結合するおよび/または該ポリペプチドと相互作用するポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび抗体を用いて、細胞内でのmRNAおよび/またはポリペプチドの産生に及ぼす添加化合物の作用を検出するためのスクリーニング法を組み立てることができる。例えば、当業界で公知の標準方法によりモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を用いて、ポリペプチドの分泌レベルまたは細胞結合レベルを測定するためのELISAアッセイを構築することができ、これは適切に操作された細胞または組織からのポリペプチドの産生を抑制または増強する物質（それぞれアンタゴニストまたはアゴニストともいう）の探索に用いることができる。

【0094】

本発明はまた、BASB059ポリペプチドもしくはポリヌクレオチドの作用を増強する（アゴニスト）もしくはブロックする（アンタゴニスト）化合物、特に静細菌性および/もしくは殺菌性の化合物を同定するための、該化合物のスクリーニング法を提供する。該スクリーニング法は、ハイスループット技術を伴いうる。例えば、アゴニストまたはアンタゴニストについてスクリーニングするために、BASB059ポリペプチドおよび該ポリペプチドの標識基質もしくはリガンドを含有する、合成反応混合物、細胞構成成分（膜、細胞エンベロープ、もしくは細胞壁）またはそれらの任意の調製物を、BASB059のアゴニストもしくはアンタゴニストでありうる候補分子の不在下または存在下でインキュベートする。該候補分子の、BASB059ポリペプチドを作動させるまたは拮抗阻害する能力は、標識リガンドの結合が減少すること、または該基質からの産物の生成が減少することに反映される。むやみに結合する、すなわちBASB059ポリペプチドの作用を誘導することなく結合する分子は、最も有望な、有効なアンタゴニストである。十分に結合する分子、および場合により基質からの産物の生成速度を上昇させる分子、シグナル伝達を増強する分子、または化学チャネル活性を増加させる分子は、アゴニストである。場合により、基質からの産物の生成、シグナル伝達、または化学チャネル活性の速度もしくはレベルの検出を、レポーター系を用いて強化させることができる。この点において有効でありうるレポーター系には、限定するもので

はないが、生成物に変換される比色用標識基質、BASB059ポリヌクレオチドもしくはポリペプチド活性の変化に反応するレポーター遺伝子、および当技術分野で公知の結合アッセイが含まれる。

【0095】

BASB059アゴニストについてのアッセイの他の例は、競合阻害アッセイに適切な条件下で、BASB059と、BASB059結合分子、組換えBASB059結合分子、天然基質もしくはリガンド、または基質もしくはリガンドミメティックを有する潜在的なアゴニストとを結合させる、競合アッセイである。BASB059を、放射性または比色用化合物などで標識することができ、それにより結合分子に結合したかまたは生成物に変換されたBASB059分子数を正確に決定して、潜在的なアンタゴニストの有効性を評価しうる。

【0096】

潜在的なアンタゴニストには他に、本発明のポリヌクレオチドおよび/もしくはポリペプチドに結合し、それによりその活性または発現を抑制するかまたは無効にする、有機小分子、ペプチド、ポリペプチドおよび抗体が含まれる。潜在的なアンタゴニストはまた、BASB059誘導性活性を誘導することなく、結合分子などの結合分子の同じ部位に結合し、それによりBASB059ポリペプチドおよび/もしくはポリヌクレオチドが結合するのを排除してBASB059ポリペプチドおよび/もしくはポリヌクレオチドの作用または発現を妨害する、有機小分子、ペプチド、非常に近縁なタンパク質または抗体などのポリペプチドでありうる。

【0097】

潜在的なアンタゴニストには、前記ポリペプチドの結合部位に結合しかつその部位を占有して、それにより細胞性結合分子と結合するのを妨害することにより正常な生物学的活性を妨げる小分子が含まれる。小分子の例としては、限定するものではないが、有機小分子、ペプチドまたはペプチド様分子が含まれる。他の潜在的なアゴニストには、アンチセンス分子（これらの分子についての記載は、Okano, J. Neurochem. 56: 560(1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL(1988)を参照のこと）が含まれる。好ましい潜在的なアンタゴニストには、BASB059に関連した化

合物およびBASB059の変異体が含まれる。

【0098】

更なる態様において、本発明は、本発明のポリペプチドまたはその断片と、各種サブクラス（IgG、IgM、IgA、IgE）の免疫グロブリンのH鎖またはL鎖の定常領域の様々な部分と、を含む遺伝子工学的に作製された可溶性融合タンパク質に関する。免疫グロブリンとしてはヒトIgG、特にIgG1のH鎖の定常部が好ましく、その場合は融合がヒンジ領域で起こる。特定の実施形態では、血液凝固Xa因子で切断され得る切断配列を組み込むことで、Fc部分を簡単に除去できる。さらに、本発明は、これら融合タンパク質の遺伝子工学的作製方法、ならびに薬物スクリーニング、診断および治療におけるそれらの使用に関する。また本発明の更なる態様は、このような融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドに関する。融合タンパク質技術の例は、国際特許出願 W094/29458 およびW094/22914に記載されている。

【0099】

本明細書に示したポリヌクレオチド配列のそれぞれは、抗菌性化合物の発見および開発に使用することができる。コード化タンパク質は発現の際に、抗菌薬のスクリーニングの標的として使用されうる。それに加えて、それぞれのmRNAのコード化タンパク質またはシャイン・ダルガーノ配列もしくはその他の翻訳促進配列のアミノ末端領域をコードするポリヌクレオチド配列を使用して、アンチセンス配列を構築し、目的のコード化配列の発現を制御することができる。

【0100】

また本発明は、病原体（1種または複数種）と、感染の続発症の原因となる真核生物（好ましくは哺乳動物）宿主との間の最初の物理的相互作用を妨害するための、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストの使用を提供する。特に、本発明の分子を使用して、細菌（特にグラム陽性菌および/またはグラム陰性菌）の、留置デバイス上の真核生物（好ましくは哺乳動物）細胞外マトリックスタンパク質または創傷内の細胞外マトリックスタンパク質への付着を妨害すること、真核生物（好ましくは哺乳動物）の細胞外マトリックスタンパク質と組織損傷を媒介する細菌性BASB059タンパク質との間の細

菌性付着をブロックすること、および/または、留置デバイスの移植またはその他の外科的手法以外により開始される感染症の病理発生の正常進行をブロックすること、ができる。

【0101】

更に本発明の他の態様により、BASB059アゴニストおよびアンタゴニスト、好ましくは静菌性または殺菌性のアゴニストおよびアンタゴニストが提供される。

【0102】

本発明のアンタゴニストおよびアゴニストを使用して、例えば、疾病を防ぎ、阻害し、および/または治療しうる。

【0103】

更なる態様において本発明は、本発明のポリペプチドのミモトープ(mimotope)に関する。ミモトープは、天然ペプチドと(配列的または構造的に)十分に類似しているペプチド配列であり、該天然ペプチドを認識する抗体により認識され得るか、あるいは適切な担体に結合した場合に該天然ペプチドを認識する抗体を生じさせることができる。

【0104】

ペプチドミモトープは、特定の目的のために、選択されたアミノ酸の付加、欠失または置換によって設計することができる。従って、該ペプチドは、タンパク質担体への結合を容易にするために改変しても良い。例えば、いくつかの化学結合法については、末端システインを含有させることが好ましい。更に、タンパク質担体に結合させたペプチドについては、該ペプチドの結合末端から遠い位置に疎水性末端を含有させて、該ペプチドの非結合末端が担体タンパク質の表面に結合したままにすることが好ましい。それにより、無傷の天然分子の場合にみられるようなペプチドのコンホーメーションと最も近似しているコンホーメーションで該ペプチドを提示する。例えば、該ペプチドは、N末端システインおよびC末端疎水性アミド化テールを含有するように改変しうる。あるいは、1以上のアミノ酸のD立体異性体の付加または置換を行うことにより、例えば該ペプチドの安定性を向上させる、有益な誘導体を作製しうる。

【0105】

あるいは、ファージディスプレイ法 (EP 0 552 267 B1) などの技法を利用して、それ自体が本発明のポリペプチドに結合する能力のある抗体を用いてペプチドミモトープを同定することができる。この方法により、天然ペプチドの構造を模擬した多数のペプチド配列が生成され、またそれゆえ該配列は、抗天然ペプチド抗体に結合する能力を有するが、該配列自体が該天然ポリペプチドと有意な配列相同性を共有する必要はない。

【0106】

ワクチン

本発明の別の態様は、個体、特に哺乳動物、好ましくはヒトにおいて免疫学的応答を誘導する方法に関するものであり、この方法は、抗体および/またはT細胞免疫応答を生じさせて該個体を感染、具体的には細菌感染、最も具体的にはナイセリア・メニンギチジス (*Neisseria meningitidis*) 感染から防御するのに十分なBASB059ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドまたはその断片もしくは変異体を該個体に接種することを含んでなる。また、そのような免疫学的応答によって細菌複製を遅延させる方法も提供する。本発明のさらに別の態様は、個体において免疫学的応答を誘導する方法であって、BASB059ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、またはその断片もしくは変異体を *in vivo* 発現させるためにBASB059ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドまたはその断片もしくは変異体の発現を指令する核酸ベクター、配列またはリボザイムを該個体に送達することにより、免疫学的応答を誘導して(例えば、抗体および/またはT細胞免疫応答(例えばサイトカイン産生T細胞または細胞傷害性T細胞を含む)を生じさせて)該個体、好ましくはヒトを疾病から防御する(この疾病がすでに該個体において確立されていようがいまいが防御する)ことを含んでなる方法に関する。遺伝子投与は、例えば、遺伝子を粒子またはその他のものにコーティングしてそれを所望の細胞に高速で射入することにより行われる。そのような核酸ベクターは、DNA、RNA、リボザイム、改変型核酸、DNA/RNAハイブリッド、DNA-タンパク質複合体またはRNA-タンパク質複合体を含み得る。

【0107】

本発明のさらなる態様は、免疫学的応答を誘導する能力を有している個体、好

ましくはヒトに導入した場合に、そのような個体においてBASB059ポリヌクレオチドおよび/または該ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドに対して免疫学的応答を誘導する免疫学的組成物に関するものであり、該組成物は、組換えBASB059ポリヌクレオチドおよび/または該ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドを含むか、および/または本発明の該BASB059ポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、またはその他のポリペプチドの抗原をコードし、発現するDNAおよび/またはRNAを含む。この免疫学的応答は、治療または予防に使用し得るものであり、抗体免疫および/または細胞性免疫、例えばCTLもしくはCD4+T細胞から生ずる細胞性免疫のような形態をとり得る。

【0108】

BASB059ポリペプチドまたはその断片は、協同タンパク質(co-protein)または化学成分(それ自体抗体を産生してもしなくてもよいが、第1のタンパク質を安定化させ、抗原性および/または免疫原性、好ましくは防御特性を有する融合タンパク質または改変タンパク質を産生させ得る)と融合してもよい。したがって、融合組換えタンパク質は、好ましくは、抗原性協同タンパク質(例えば、インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)由来のリポタンパク質D、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)もしくは β -ガラクトシダーゼ)、またはタンパク質を可溶化して、その産生および精製を容易にする任意のその他の比較的大きい協同タンパク質をさらに含む。さらに、協同タンパク質は、該タンパク質を投与される生物の免疫系に全身性刺激(*generalized stimulation*)をもたらすという意味でアジュバントとして作用し得る。協同タンパク質は、第1のタンパク質のアミノ末端またはカルボキシ末端に結合され得る。

【0109】

本発明のワクチン組成物においては、BASB059ポリペプチドおよび/もしくはポリヌクレオチド、あるいはその断片、ミモトープ、または変異体が、上記の生存組換えベクター(例えば生存細菌性ベクター)等のベクター中に存在していてもよい。

【0110】

BASB059ポリペプチドに対しては非生存ベクターも好適であり、例えば細菌性外膜(OM)小胞もしくは「ブレブ(bleb)」が挙げられる。OMブレブはグラム陰性細菌の二重層膜の外膜に由来するものであり、多くのグラム陰性細菌(トラコーマ・クラミジア(*C. trachomatis*)およびオウム病クラミジア(*C. psittaci*)を含む)において明示されている(Zhou, Lら. 1998. *FEMS Microbiol. Lett.* 163:223-228)。また、ブレブを生成することが報告された細菌病原体の非網羅的列挙としては、以下のものが挙げられる: 百日咳菌(*Bordetella pertussis*)、ライム病ボレリア(*Borrelia burgdorferi*)、ブルセラ・メリテンシス(*Brucella melitensis*)、ブルセラ・オビス(*Brucella ovis*)、大腸菌(*Escherichia coli*)、インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)、レジオネラ・ニューモフィラ(*Legionella pneumophila*)、淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、ナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、およびエルシニア・エンテロコリチカ(*Yersinia enterocolitica*)。

【0111】

ブレブは外膜タンパク質を天然コンホーメーションで供給するという利点があり、したがって特にワクチン用に有用である。ブレブはまた、細菌を遺伝子工学的に操作して外膜における1以上の分子の発現を改変することにより、ワクチン用途向けに改良することもできる。すなわち、例えば外膜にある所望の免疫原性タンパク質(BASB059ポリペプチド等)の発現を、誘導したりアップレギュレートしたり(例えばプロモーターを改変することによって)することができる。その代わりに、あるいはそれに加えて、関連のない(例えば、非防御抗原、または免疫優性(immunodominant)であるが変異性のタンパク質)かまたは有害(例えば、LPS等の毒性分子または自己免疫応答の潜在的誘導因子)である外膜分子の発現をダウンレギュレートすることもできる。これらの方法はより詳細に後述する。

【0112】

BASB059遺伝子の非コードランキング領域は、該遺伝子の発現において重要な調節エレメントを含む。この調節は、転写レベルおよび翻訳レベルの両方で起こる。前記遺伝子のオープンリーディングフレームの上流または下流にあるこれ

らの領域の配列は、DNA配列決定によって得ることができる。この配列情報により、各種プロモーターエレメント、ターミネーター配列、誘導性配列エレメント、リプレッサー、相変異の原因となるエレメント、シャイン・ダルガーノ配列、調節に関与する二次構造をとりうる領域等の、潜在的調節モチーフ、およびその他の種類の調節モチーフもしくは配列を決定することができる。この配列は本発明のさらなる様態である。

【0113】

この配列情報により、BASB059遺伝子の天然発現をモジュレートすることができる。遺伝子発現のアップレギュレーションは、プロモーター、シャイン・ダルガーノ配列、潜在的リプレッサーもしくはオペレーターエレメント、または関与するその他の任意のエレメントを改変することにより行うことができる。同様に、発現のダウンレギュレーションも同様の種類の改変により行うことができる。あるいは、相変異配列を変更することにより、上記遺伝子の発現を相変異調節下に置くことができるが、該発現はこの調節と共役しなくてもよい。別の方法では、上記遺伝子の発現を、発現を調節できる1以上の誘導性エレメントの制御下に置くことができる。上記のような調節の例としては、限定するものではないが、温度変化による誘導、誘導物質（選択された炭水化物またはその誘導体等）、微量元素、ビタミン、補因子、金属イオン等の添加が挙げられる。

【0114】

上記のような改変は、いくつかの異なる手段によって導入できる。遺伝子発現に関与する配列の改変を、ランダム突然変異誘発およびそれに続く所望の表現型の選択により、*in vivo*で引き起こすことができる。別の方法は、目的の領域を単離して、さらにランダム突然変異誘発、または部位特異的置換、挿入、もしくは欠失突然変異誘発によってそれを改変することによる。次いで改変領域を相同組換えにより細菌ゲノム中に再導入して、遺伝子発現に対する効果を評価することができる。別の方法としては、目的の領域の配列情報を用いて、天然の調節配列の全部もしくは一部を置換または削除することができる。この場合、標的とする調節領域を単離し改変して、別の遺伝子由来の調節エレメント、各種遺伝子由来の調節エレメントの組み合わせ、合成調節領域、または他の任意の調節領域を

含むようにしたり、野生型調節配列の選択部分を削除したりする。これらの改変配列を、ゲノム中での相同組換えにより細菌中に再導入することができる。遺伝子発現のアップレギュレーションのために用いることができる好ましいプロモーターとしては、非網羅的列挙にすぎないが、以下のものが挙げられる：ナイセリア・メニンギチジスまたは淋菌由来のプロモーター *porA*、*porB*、*lbpB*、*tbpB*、*p110*、*lst*、*hpuAB*；モラクセラ・カタラーリス(*M. Catarrhalis*)由来の*ompCD*、*copB*、*lbpB*、*ompE*、*UspA1*、*UspA2*、*TbpB*；インフルエンザ菌(*H. influenzae*)由来の*p1*、*p2*、*p4*、*p5*、*p6*、*lpD*、*tbpB*、*D15*、*Hia*、*Hmw1*、*Hmw2*。

【0115】

ある実施例では、遺伝子のプロモーターをより強力なプロモーターと交換することにより、該遺伝子の発現をモジュレートすることができる。かかるプロモーターの交換は、該遺伝子上流配列を単離し、この配列を *in vitro* で改変し、これを相同組換えによりゲノムに再導入することによって実施することができる。細菌ならびに該細菌から放出(*shed*)された(または生成された)外膜小胞において、発現をアップレギュレートすることができる。

【0116】

他の実施例では、記載した方法を用いて、ワクチンに使用するための改善された特性を有する組換え細菌株を作製することができる。これらの株としては、限定するものではないが、弱毒化株、選択された抗原の発現が増大した株、免疫応答を妨害する遺伝子をノックアウトした(または該遺伝子の発現が低減した)株、免疫優性タンパク質の発現がモジュレートされた株、外膜小胞の放出がモジュレートされた株が挙げられる。

【0117】

したがって、BASB059遺伝子の改変された上流領域もまた、本発明により提供される。これらの改変された上流領域は、外膜に位置するBASB059タンパク質の発現レベルを変更する異種調節エレメントを含んでいる。本発明のこの態様による前記上流領域は、BASB059遺伝子上流の配列を含む。前記上流領域はBASB059遺伝子のすぐ上流から始まり、通常は前記遺伝子のATG開始コドンから約1000bp程度上流の位置まで続く。ポリシストロン性配列(オペロン)内に位置する遺伝子

の場合、上流領域は対象とする遺伝子の直前または該オペロン中の最初の遺伝子の直前から始まっているもよい。好ましくは、本発明のこの態様による改変された上流領域は、ATGの500～700bp上流の位置に異種プロモーターを含む。

【0118】

したがって本発明は、BASB059ポリペプチドを、改変した細菌ブレブ中へ提供する。本発明はさらに、非生存膜ベースのブレブベクターを生成することのできる改変された宿主細胞を提供する。本発明はさらに、異種調節エレメントを含む改変型上流領域を有するBASB059遺伝子を含む核酸ベクターを提供する。

【0119】

さらに本発明によれば、本発明の宿主細胞および細菌ブレブを調製する方法が提供される。

【0120】

また本発明は、本発明のポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドならびに免疫刺激性DNA配列(例えば、Sato, Yら, Science 273:352(1996)に記載されているもの等)を含む組成物、特にワクチン組成物、ならびに方法も提供する。

【0121】

また、本発明は、細菌細胞表面タンパク質の非可変領域をコードすることが分かっている既知のポリヌクレオチドまたはその特定の断片を、ナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)に感染した動物モデルでのそのような遺伝子による免疫感作実験に用いられるポリヌクレオチド構築物において使用方法も提供する。そのような実験は、予防または治療的免疫応答を生起させ得るタンパク質エピトープを同定するのに特に有用である。この手法により、その後、哺乳動物、特にヒトにおける細菌感染、特にナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)感染の予防剤または治療的処置の開発のために、感染しないことまたは感染を除去することに成功している動物の必須の器官に由来する特定力価のモノクローナル抗体の調製が可能になると考えられる。

【0122】

また本発明は、本発明の免疫原性組換えポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドならびに製薬上許容される担体などの適当な担体を含むワクチン製剤も

提供する。このポリペプチドおよびポリヌクレオチドは胃の中で分解される可能性があるため、どちらも非経口的に（例えば、皮下、筋肉内、静脈内または皮内注射により）投与することが好ましい。非経口投与に適した製剤としては、酸化防止剤、緩衝剤、静菌性化合物およびこの製剤を受容者の体液、好ましくは血液と等張にする溶質を含みうる水性および非水性の無菌注射液、並びに懸濁化剤または増粘剤を含みうる水性および非水性の無菌懸濁液がある。こうした製剤は1回量容器または数回量容器（例えば、密閉アンプルおよびバイアル）で提供することができ、また、使用直前に無菌の液状担体を添加するだけでよい凍結乾燥状態で保管することもできる。

【0123】

また、本発明のワクチン製剤は該製剤の免疫原性を増強するためのアジュバント系を含んでいてもよい。好ましくは、前記アジュバント系は優先的にTH1型の応答を生じさせる。

【0124】

免疫応答は極端な2つのカテゴリー（体液性または細胞性免疫応答[従来からそれぞれ、抗体による、および細胞性エフェクターによる防御機構によって特徴付けられている]）に大まかに区別することができる。これらの応答カテゴリーは、TH1型応答（細胞性応答）およびTH2型免疫応答（体液性応答）と呼ばれている。

【0125】

極端なTH1型免疫応答は、抗原特異的でハプロタイプ拘束性細胞傷害性Tリンパ球の産生およびナチュラルキラー細胞の応答により特徴付けられる。マウスではTH1型応答はIgG2aサブタイプの抗体の産生により特徴付けられることが多いが、ヒトではこれらはIgG1型抗体に相当する。TH2型免疫応答はマウスIgG1、IgAおよびIgMを含む広範囲の免疫グロブリンアイソタイプの産生により特徴付けられる。

【0126】

これらの2タイプの免疫応答の発達において、陰の原動力となっているのはサイトカインであると考えられる。高濃度のTH1型サイトカインは所与の抗原に対して細胞性免疫応答を優先的に誘導する傾向があるが、高濃度のTH2型サイトカ

インは前記抗原に対して体液性免疫応答を優先的に誘導する傾向がある。

【0127】

TH1型およびTH2型免疫応答の区別は絶対的なものではない。実際、ある個体は、主にTH1である、または主にTH2であると記載されるような免疫応答を有している。しかしながら、多くの場合、MosmannおよびCoffmanによりマウスCD4+ve T細胞クローンについて記載された内容(Mosmann, T.R. およびCoffmann, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, p145-173)から、サイトカインのファミリーを考えることが都合がよい。慣例上、TH1型応答はTリンパ球によるINF- およびIL-2サイトカイン産生と関連している。TH1型免疫応答の誘導に直接関わることの多い他のサイトカインは、IL-12等のT細胞によっては産生されない。対照的に、TH2型応答はIL-4、IL-5、IL-6およびIL-13の分泌に関連している。

【0128】

特定のワクチンアジュバントがTH1またはTH2型のいずれかのサイトカイン応答の刺激にとりわけ適していることが知られている。慣例上、ワクチン接種または感染後の免疫応答における、TH1：TH2平衡の最良の指標としては、抗原再刺激後のin vitroでのTリンパ球によるTH1もしくはTH2サイトカイン産生を直接測定すること、および/または抗原特異的抗体応答のIgG1：IgG2a比の測定が挙げられる。

【0129】

従って、TH1型アジュバントは、抗原によりin vitroで再刺激された際に単離されたT細胞集団を優先的に刺激して高濃度のTH1型サイトカインを産生し、CD8+細胞傷害性Tリンパ球の発生およびTH1型アイソタイプに関連した抗原特異的免疫グロブリン応答を促進するものである。

【0130】

TH1細胞応答を優先的に刺激し得るアジュバントは、国際特許出願番号W094/00153およびW095/17209に記載されている。

【0131】

3De-0-アシル化モノホスホリルリピドA (3D-MPL) はそうしたアジュバントの1つである。これはGB2220211(Ribi)により知られている。化学的には、該アジュバントは3De-0-アシル化モノホスホリルリピドAと4、5、6本のアシル化された鎖との混合物であり、Ribi Immunochem. Montanaにより製造される。3De-0-アシル化モノホスホリルリピドAの好ましい形態は、欧州特許第0 689 454 B1号(SmithKline Beecham Biologicals SA)に開示されている。

【0132】

好ましくは、3D-MPLの粒子は、0.22ミクロンの膜を通過して滅菌ろ過するのに十分な程小さな粒子である(欧州特許第0 689 454 号)。

【0133】

3D-MPLは投与量あたり10 µg ~ 100 µg、好ましくは25 ~ 50 µgの範囲で存在する。この場合、抗原は通常投与量あたり2 ~ 50 µgの範囲で存在する。

【0134】

別の好ましいアジュバントは、QS21(Quillaja Saponaria Molinaの樹皮から得た、Hplc精製した毒性の無い画分)を含む。任意でこれを3De-0-アシル化モノホスホリルリピドA (3D-MPL) と、場合により担体と共に混合することもできる。

【0135】

QS21の製造方法は米国特許第5,057,540号に開示されている。

【0136】

QS21を含有する反応性の無いアジュバント製剤は以前に記載されている(W096/33739)。QS21およびコレステロールを含むこのような製剤は、抗原と共に製剤化する場合には良好なTH1刺激性アジュバントであることが示されている。

【0137】

TH1細胞応答の優先的刺激物質である別のアジュバントとしては、免疫調節性のオリゴヌクレオチド、例えばW096/02555に開示されている非メチル化CpG配列が挙げられる。

【0138】

また、前述したもののような異なるTH1刺激アジュバントの組み合わせも、TH1細胞応答の優先的な刺激物質であるアジュバントを提供する際に考慮される。例

例えば、QS21を3D-MPLと共に製剤化することができる。通常、QS21:3D-MPL比は1:10~10:1であり、好ましくは1:5~5:1であり、多くの場合は実質的に1:1である。最適な共働作用のために好ましい範囲は、2.5:1~1:1の3D-MPL:QS21である。

【0139】

好ましくは、本発明のワクチン組成物中には担体も存在する。該担体は水中油型エマルジョンであっても、リン酸アルミニウムまたは水酸化アルミニウム等のアルミニウム塩であってもよい。

【0140】

好ましい水中油型エマルジョンは代謝可能な油、例えばスクアレン、 α -トコフェロールおよびTween80を含む。特に好ましい態様では本発明のワクチン組成物中の抗原をそのようなエマルジョン中でQS21および3D-MPLと組み合わせる。更に、前記水中油型エマルジョンはスパン85および/またはレシチンおよび/またはトリカプリリン(tricaprylin)を含んでいてもよい。

【0141】

通常、ヒトへの投与の場合は、QS21および3D-MPLは投与量あたり1~200 μ gの範囲内、例えば10~100 μ g、好ましくは10~50 μ gの範囲内でワクチン中に存在する。通常、水中油型エマルジョンは、2~10%のスクアレン、2~10%の α -トコフェロールおよび0.3~3%のTween80を含む。好ましくは、スクアレン: α -トコフェロール比は1以下であり、これによってより安定なエマルジョンが提供される。また、スパン85は1%という濃度で存在しうる。幾つかの場合、本発明のワクチンが更に安定化剤を含むことが有益であろう。

【0142】

毒性の無い水中油型エマルジョンは、好ましくは、毒性の無い油(例えばスクアレンもしくはスクアレン)、乳化剤(例えばTween80)を水性担体中に含む。該水性担体は、例えば、リン酸緩衝化生理食塩水でありうる。

【0143】

水中油型エマルジョン中にQS21、3D-MPLおよび α -トコフェロールを含む特に有効なアジュバント製剤はW095/17210に記載されている。

【0144】

また本発明は、本発明のワクチン製剤を他の抗原、特に癌、自己免疫疾患および関連病態の治療に有用な抗原と組み合わせて含む多価ワクチン組成物を提供する。そのような多価ワクチン組成物は前記のTH1誘導性アジュバントを含みうる。

【0145】

本発明は、特定のBASB059ポリペプチドおよびポリヌクレオチドに関して記載されているが、本発明はその天然のポリペプチドおよびポリヌクレオチドの断片、ならびに組換えポリペプチドまたはポリヌクレオチドの免疫原性に実質的に影響を及ぼさない付加、欠失または置換をもつ類似のポリペプチドおよびポリヌクレオチドを含むものと理解されるべきである。

【0146】

抗原は、全細菌(死んでいても生存していてもよい)の形態でも、細胞成分画分としても送達可能であり、このような可能性にはナイセリア・メニンギチジス(*N. meningitides*)自体が含まれる。

【0147】

組成物、キットおよび投与

本発明のさらなる態様では、細胞または多細胞生物に投与するためのBASB059ポリヌクレオチドおよび/またはBASB059ポリペプチドを含む組成物が提供される。

【0148】

また本発明は、本明細書で検討したポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドまたはそのアゴニストまたはアンタゴニストを含む組成物にも関する。本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、細胞、組織または生物に使用するために、非滅菌担体または滅菌担体(例えば個体への投与に適した製薬用担体など)とともに用いてもよい。そのような組成物は、例えば、培地添加剤または治療上有効な量の本発明のポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドならびに製薬上許容される担体または賦形剤を含む。かかる担体としては、限定するものではないが、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノールおよびそれらの組み合わせが挙げられ得る。製剤は投与の様式に

適合させるべきである。本発明はさらに、本発明の上記組成物の1種以上の成分を充填した容器を1以上含んでなる診断用および製剤用のパックおよびキットに関する。

【0149】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチドおよびその他の化合物は、単独で用いてもよく、治療用化合物などのその他の化合物とともに用いてもよい。

【0150】

医薬組成物は、任意の有効で都合のよい様式、例えば、特に局所投与、経口投与、肛門投与、腔内投与、静脈内投与、腹腔内投与、筋肉内投与、皮下投与、鼻腔内投与、または経皮経路での投与によって投与し得る。

【0151】

治療または予防において、かかる活性成分は注射可能な組成物として、例えば無菌水性分散液、好ましくは等張液として、個体に投与し得る。

【0152】

更なる態様においては、本発明は、治療に有効な量のポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチド（例えば可溶性形態の本発明のポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチド）、アゴニストペプチド/アンタゴニストペプチド、または低分子化合物を、製薬上許容し得る担体または賦形剤と組み合わせて含む医薬組成物を提供する。そのような担体には、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノールおよびそれらの組合せが含まれるが、これらに限定されるものではない。本発明はさらに、前述の本発明の組成物の1種以上の成分を充填した容器を1以上含んでなる医薬用パックおよびキットに関するものである。本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび他の化合物は、単独で用いてもよく、または治療用化合物等の他の化合物と組み合わせて用いてもよい。

【0153】

医薬組成物は投与経路、例えば全身または経口による投与経路に適合させることができる。全身投与に適切な形態は、注入（注射）、典型的には静脈注射である。皮下、筋肉内または腹腔内のような他の注入経路も使用できる。全身投与の

別の手段には、胆汁酸塩、フシジン酸、その他の界面活性剤などの浸透剤を用いた経粘膜および経皮投与がある。さらに、本発明のポリペプチドまたは他の化合物を腸溶剤またはカプセル剤として製剤化し得るのであれば、経口投与も可能である。これらの化合物を軟膏、ペースト、ゲル、溶液、粉末などの剤形で局所に投与しても、かつ/または局在化させてもよい。

【0154】

哺乳動物、特にヒトへの投与の場合、該活性成分の日用量は0.01mg/kg～10mg/kg、典型的には約1mg/kgであると予想される。医師は、任意の状況において、個体に最も適した実際の投与量(これは特定の個体の年齢、体重および応答により様々である)を決定するであろう。上記の投与量は、平均的な場合の代表例である。もちろん、より高いまたはより低い投与量の範囲が利点を有するような場合もある。そのような場合も本発明の範囲に含まれる。

【0155】

必要な投与量の範囲は、ペプチドの選択、投与経路、製剤の性質、患者の状態の性質、そして治療する医師の判断に左右される。しかし、適当な投与量は患者の体重1kgあたり0.1～100 μ gの範囲内である。

【0156】

ワクチン組成物は、注射可能な形態であるのが都合がよい。通常のアジュバントを用いることにより免疫応答を高めることができる。ワクチン接種に適した単位投与量は、0.5～5マイクログラム/kgの抗原であり、そのような投与量を1～3週間間隔で1～3回投与するのが好ましい。前記の投与量範囲で本発明の化合物を用いた場合、適当な個体への投与を不可能とするような有害な中毒作用は観察されない。

【0157】

しかしながら、入手可能な化合物が多様であること、投与経路の効率が異なることを考慮すれば、必要とされる投与量は広範に変動することが予測される。例えば、経口投与は静注による投与よりも高い投与量を必要とすると予想されよう。こうした投与量レベルの変更は、当業界でよく理解されているような、標準的経験的な最適化手順を用いて調整することができる。

【0158】

配列データベース、有形媒体(tangible medium)における配列、およびアルゴリズム

ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの配列は、その2次元構造および3次元構造を決定し、類似の相同性をもつ別の配列を同定する際の価値ある情報源を提供する。これらの手法は、コンピュータ読取り可能な媒体中に配列を保存し、次いで既知の巨大分子構造プログラムにおいて、またはGCGプログラムパッケージなどの公知の検索ツールにより配列データベースを検索するためにその保存データを用いることで、最大限に促進される。

【0159】

また、本発明は、文字配列または列、特に遺伝子配列またはコード化タンパク質配列の解析方法も提供する。好ましい配列解析方法としては、例えば、同一性および類似性解析などの配列相同性解析法、DNA、RNAおよびタンパク質構造解析法、配列のアセンブリ方法、分岐解析法、配列モチーフ解析法、オープンリーディングフレーム決定法、核酸塩基コーリング(calling)法、コドン使用頻度解析法、核酸塩基トリミング(trimming)法、および配列決定クロマトグラムピーク解析法が挙げられる。

【0160】

相同性の同定を行うためのコンピュータに基づく方法であって、コンピュータ読取り可能な媒体中に本発明のポリヌクレオチドの配列を含む第1ポリヌクレオチド配列を提供する工程、および該第1ポリヌクレオチド配列を少なくとも1つの第2のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列と比較して相同性を同定する工程を含む上記方法を提供する。

【0161】

相同性の同定を行うためのコンピュータに基づく方法であって、コンピュータ読取り可能な媒体中に本発明のポリペプチドの配列を含む第1ポリペプチド配列を提供する工程および該第1ポリペプチド配列を少なくとも1つの第2のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列と比較して相同性を同定する工程を含む上記方法も提供される。

【0162】

限定するものではないが、特許および特許出願のような本明細書で引用した刊行物および参考文献は、あたかも各刊行物または参考文献がそれぞれ本明細書に参照により組み込まれることが具体的にかつ個別に指摘されているように、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる。本出願が優先権を主張している任意の特許出願も、刊行物および参考文献について上記したように、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる。

【0163】

定義

当技術分野で知られた「同一性」とは、場合によっては、ポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列の比較により決定された、2以上のかかる配列間の類縁性のことである。当技術分野ではまた、「同一性」は、場合によっては、ポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列の鎖間の一致度(match)により決定された、このような配列間の配列類縁性の程度を意味する。「同一性」は公知の方法により難なく算出することができ、こうした方法として、例えば Computational Molecular Biology, Lesk, A.M.編, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W. 編, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M. and Griffin, H.G. 編, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J. 編, M Stockton Press, New York, 1991; および Carillo, H. and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988) に記載された方法があるが、これらに限らない。同一性を決定するための方法は、検討する配列間で最大級のマッチングが得られるように設計される。同一性を決定する方法は一般に入手可能なコンピュータプログラムに編集されている。2配列間の同一性を決定するためのコンピュータプログラム法としては、GCGプログラムパッケージにおけるGAPプログラム(Devereux, J.ら, Nucleic Acids Research 12(1):387 (1984))、BLASTP、BLASTN(Altschul, S.F.ら, J. Molec. Biol. 215:403-410 (1990)) ならびにFASTA(Pearsonおよ

びLipman Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85; 2444-2448(1988)があるが、これらに限らない。BLASTプログラムファミリーはNCBIおよび他のソースから一般に入手可能である (BLAST Manual, Altschul, S.ら, NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S.ら, J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990))。公知のSmith Watermanアルゴリズムも同一性の決定に使用することができる。

【0164】

ポリペプチド配列を比較するためのパラメーターは次のものを含む：

アルゴリズム：Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970)

比較マトリックス：BLOSSUM62、Hentikoff and Hentikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 10915-10919 (1992)

ギャップペナルティ：8

ギャップ長ペナルティ：2

これらのパラメーターを用いて有効なプログラムは Genetics Computer Group (Madison WI) から「gap」プログラムとして一般に入手可能である。前記のパラメーターはペプチド比較のためのデフォルトパラメーター(default parameter) である (末端ギャップのペナルティは無し)。

【0165】

ポリヌクレオチド配列を比較するためのパラメーターは次のものを含む：

アルゴリズム：Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970)

比較マトリックス：マッチ = +10、ミスマッチ = 0

ギャップペナルティ：50

ギャップ長ペナルティ：3

これらのパラメーターを用いて有用であるプログラムは Genetics Computer Group (Madison WI) から「gap」プログラムとして公に入手可能である。これらは核酸比較のためのデフォルトパラメーターである。

【0166】

ポリヌクレオチドとポリペプチドについての「同一性」の好ましい意味は、場合によっては、下記の(1)および(2)に示される。

(1) ポリヌクレオチドの実施形態は、配列番号1の基準配列に対して少なくとも

50、60、70、80、85、90、95、97または100%の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドをさらに含む。ここで、該ポリヌクレオチド配列は、配列番号1の基準配列と同一であるか、または該基準配列に対して、一定の整数個までのヌクレオチド変異を含んでいてもよい。そのような変異は少なくとも1個のヌクレオチドの欠失、置換（トランジションおよびトランスバージョンを含む）または挿入よりなる群から選択され、こうした変異は基準ヌクレオチド配列の5'もしくは3'末端位置、またはこれらの末端位置の間のどこに存在してもよく、基準配列中のヌクレオチドの間に個々に、または基準配列内に1以上の連続するグループとして散在する。そのようなヌクレオチド変異の数は、配列番号1のヌクレオチドの総数に、同一性%を示す整数を100で割った値を掛け、次いでその積を配列番号1のヌクレオチドの総数から差し引くことにより、すなわち、次式：

$$n_n = x_n - (x_n \cdot y)$$

により求めることができる。式中、 n_n はヌクレオチド変異の数であり、 x_n は配列番号1のヌクレオチドの総数であり、 y は50%については0.50、60%については0.60、70%については0.70、80%については0.80、85%については0.85、90%については0.90、95%については0.95、97%については0.97または100%については1.00であり、 \cdot は掛算演算子の記号であり、さらに x_n と y の非整数の積は、その積を x_n から引く前に、最も近似する整数に切り下げる。配列番号2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の改変は、そのコード配列にナンセンス、ミスセンスまたはフレームシフト突然変異を生じさせ、それにより、こうした変異後に該ポリヌクレオチドによりコードされたポリペプチドを改変させることができる。

【0167】

例として、本発明のポリヌクレオチド配列は、配列番号1の基準配列と同一である、すなわち基準配列に対して100%の同一性を有し得るか、または同一性%が100%未満となるように該基準配列に対して一定の整数個までの核酸変異を含んでいてもよい。そのような変異は少なくとも1個の核酸の欠失、置換（トランジションおよびトランスバージョンを含む）または挿入よりなる群から選択され

、こうした変異は基準ポリヌクレオチド配列の 5' もしくは 3' 末端位置、またはこれらの末端位置の間どこに存在してもよく、基準配列中の核酸の間に個々に、または基準配列内に1以上の連続するグループとして散在する。所定の同一性%についての核酸変異の数は、配列番号1の核酸の総数に、同一性%値を示す整数を100で割った値を掛け、次いでその積を配列番号1の核酸の総数から差し引くことにより、すなわち、次式：

$$n_n = x_n - (x_n \cdot y)$$

により求めることができる。式中、 n_n は核酸変異の数であり、 x_n は配列番号1の核酸の総数であり、 y は例えば70%については0.70、80%については0.80、85%については0.85などであり、 \cdot は掛算演算子の記号であり、さらに x_n と y の非整数の積は、その積を x_n から引く前に、最も近似する整数に切り下げる。

(2) ポリペプチドの実施形態は、配列番号2のポリペプチド基準配列に対して少なくとも50、60、70、80、85、90、95、97または100%の同一性を有するポリペプチドを含む単離されたポリペプチドをさらに含む。ここで、該ポリペプチド配列は、配列番号2の基準配列と同一であるか、または該基準配列に対して、一定の整数個までのアミノ酸変異を含んでいてもよい。そのような変異は少なくとも1個のアミノ酸の欠失、置換（保存的および非保存的置換を含む）または挿入よりなる群から選択され、こうした変異は基準ポリペプチド配列のアミノまたはカルボキシ末端位置、またはこれらの末端位置の間どこに存在してもよく、基準配列中のアミノ酸の間に個々に、または基準配列内に1以上の連続するグループとして散在する。そのようなアミノ酸変異の数は、配列番号2のアミノ酸の総数に、同一性%を示す整数を100で割った値を掛け、次いでその積を配列番号2のアミノ酸の総数から差し引くことにより、すなわち、次式：

$$n_a = x_a - (x_a \cdot y)$$

により求めることができる。式中、 n_a はアミノ酸変異の数であり、 x_a は配列番号2のアミノ酸の総数であり、 y は50%については0.50、60%については0.60、70%については0.70、80%については0.80、85%については0.85、90%については0.90、95%については0.95、97%については0.97または100%については1.00であり、 \cdot は掛算演算子の記号であり、さらに x_a と y の非整数の積は、その積

を x_a から引く前に、最も近似する整数に切り下げる。

【0168】

例として、本発明のポリヌクレオチド配列は、配列番号2の基準配列と同一である、すなわち基準配列に対して100%の同一性を有し得るか、または同一性%が100%未満となるように該基準配列に対して一定の整数個までのアミノ酸変異を含んでいてもよい。そのような変異は少なくとも1個のアミノ酸の欠失、置換（保存的および非保存的置換を含む）または挿入よりなる群から選択され、こうした変異は基準ポリペプチド配列のアミノもしくはカルボキシ末端位置、またはこれらの末端位置の間どこに存在してもよく、基準配列中のアミノ酸の間に個々に、または基準配列内に1以上の連続するグループとして散在する。所定の同一性%についてのアミノ酸変異の数は、配列番号2のアミノ酸の総数に、同一性%値を示す整数を100で割った値を掛け、次いでその積を配列番号2のアミノ酸の総数から差し引くことにより、すなわち、次式：

$$n_a = x_a - (x_a \cdot y)$$

により求めることができる。式中、 n_a はアミノ酸変異の数であり、 x_a は配列番号2のアミノ酸の総数であり、 y は例えば70%については0.70、80%については0.80、85%については0.85などであり、 \cdot は掛算演算子の記号であり、さらに x_a と y の非整数の積は、その積を x_a から引く前に、最も近似する整数に切り下げる。

【0169】

「個体」は、本明細書で生物に関して用いられる場合、多細胞真核生物、例えば限定するものではないが、後生動物、哺乳動物、ヒツジ(ovid)、ウシ(bovid)、サル(simian)、霊長類、ヒトなどを意味する。

【0170】

「単離された」とは、天然の状態から「人間の手によって」改変されたことを意味し、すなわち「単離された」組成物または物質が天然に存在するのであれば、それはそのもとの環境から変化しているか分離されており、またはその両方である。例えば、生存している生物の体内に自然界で存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離された」ものではないが、その天然状態の共存物質か

ら分離されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、本明細書中で用いられるように、「単離された」ものである。さらに、形質転換、遺伝子操作または任意のその他の組換え法により生物に導入されるポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、該生物（生物は生きていても生きていなくてもよい）中に存在しているとしても「単離された」ものである。

【0171】

「ポリヌクレオチド」とは、一般に任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドを指し、これは一本鎖および二本鎖の領域を含む、修飾されていないRNAもしくはDNA、または修飾されたRNAもしくはDNAであり得る。

【0172】

「変異体」とは、基準のポリヌクレオチドまたはポリペプチドと異なるが、不可欠な性質を保持しているポリヌクレオチドまたはポリペプチドのことである。典型的なポリヌクレオチドの変異体は基準ポリヌクレオチドとヌクレオチド配列の点で相違する。この変異体のヌクレオチド配列の変化は、基準ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変更しても、しなくてもよい。ヌクレオチドの変化は、以下で述べるように、基準配列によりコードされるポリペプチドのアミノ酸の置換、欠失、付加、融合および末端切断（トランケーション）をもたらす。典型的なポリペプチドの変異体は基準ポリペプチドとアミノ酸配列の点で相違する。一般的には、基準ポリペプチドの配列と変異体の配列が全般的によく類似しており、多くの領域で同一となるような相違に限られる。変異体と基準ポリペプチドは任意に組み合わせた1以上の置換、欠失、付加によりアミノ酸配列が相違してよい。置換または挿入されるアミノ酸残基は遺伝子コードによりコードされるものであっても、なくてもよい。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変異体は対立遺伝子変異体のように天然に存在するものでも、天然に存在することが知られていない変異体であってもよい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの天然に存在しない変異体は、突然変異誘発法または直接合成により作製することができる。

【0173】

「疾患」は、細菌による感染によって引き起こされるか、該感染に関連した任

意の疾病を意味する。例えば、上気道感染、菌血症および髄膜炎のような侵入性細菌性疾患が挙げられる。

【0174】

実施例

下記の実施例は、特に詳細に記載した場合を除き、当業者によく知られた常用の標準的方法により行った。これらの実施例は説明のためのものであり、本発明を限定するものではない。

【0175】

実施例1：ナイセリア・メニンギチジス(N. meningitidis)B血清群株ATCC 13090のBASB059の配列

ナイセリア・メニンギチジス(N. meningitides)の株ATCC 13090のBASB059遺伝子の配列を配列番号1に示す。BASB059ポリヌクレオチド配列の翻訳配列(配列番号2に示す)は、いずれの既知のタンパク質に対しても何ら有意な類似性を示さなかった。しかしながら、該BASB059ポリペプチドは、リポタンパク質に特徴的なシグナル配列を含有している。

【0176】

実施例2：組換えBASB059を発現するプラスミドの構築

A: BASB059のクローニング

順方向プライマーLip15-Fm/p (5'-AGGCAGAGGCATATGAACACACGCATCATCGTTTC-3') (配列番号3)および逆方向プライマーLip15-RCf/p (5'-AGGCAGAGGCTCGAGGCAACGGCCTGCCGCTTTAAGC-3') (配列番号4)の両増幅プライマーに、遺伝子操作によりNdeIおよびXhoI制限部位をそれぞれ組込み、BASB059のPCR産物の低コピー数性大腸菌発現プラスミドpET24b中への方向性の定まったクローニングを行い、BASB059タンパク質がC末端に(His)₆アフィニティータグを含む融合タンパク質として発現され得るようにした。シリカゲルに基づくスピンカラム(QiaGen)を用いて、製造者の指示に従い、BASB059PCR産物を増幅反応液から精製した。クローニングに必要なNdeIおよびXhoI末端を作製するために、製造者(Life Technologies)が推奨するように制限酵素NdeIおよびXhoIを連続的に使用して、精製PCR産物を完全に消化した。最初の制限酵素消化に続いて、該PCR産物を前述のスピンカラムを通

して精製して脱塩し、滅菌水で溶出後、第2の酵素消化を行った。消化されたDNA断片は、シリカゲルに基づくスピンカラムを用いて再び精製した後、pET24bプラスミドに連結した。

【0177】

B: 発現ベクターの作製

連結させる発現プラスミドpET24bを調製するために、該プラスミドを同様にNdeIおよびXhoIの両方で完全に消化し、その後、自己連結を防止するために、製造者の指示のとおり仔ウシ腸ホスファターゼ(CIP、1 pmoleの5'末端あたり約0.02ユニット、Life Technologies)で処理した。調製したベクターに対し過剰な約5倍のモルの消化した断片を用いてライゲーション反応液を作製した。T4 DNAリガーゼ(1反応あたり約2.0ユニット、Life Technologies)を用いて、当技術分野で周知の方法により約20 µlでの標準的なライゲーション反応(約16℃、約16時間)を実施した。該ライゲーション反応液のアリコート(約5 µl)を用いて、当技術分野で周知の方法によりエレクトロコンピテント(electro-competent)BL21DE3細胞を形質転換した。約1.0mlのLBブロス中で約2~3時間37℃で増殖させた後、形質転換細胞をカナマイシン(100 µg/ml)含有LB寒天プレート上に播いた。確実に全ての形質転換細胞がpET24bプラスミド(KnR)を含有するようにするために、該抗生物質を選択培地中に含有させた。プレートは、37℃で一晩(約16時間)インキュベートした。各KnRコロニーを滅菌した楊枝で拾い、新しいLBのKnRプレートへの「継代」接種、ならびに約1.0mlのLBのKnRRブロス中での培養に用いた。継代プレートおよびブロス培養は、標準的インキュベーター内(プレート)または振盪水浴内のいずれかで、37℃で一晩インキュベートした。

【0178】

全細胞に基づくPCR解析を、上記形質転換体がBASB059 DNAインサートを含有することを証明するために用いた。ここで、一晩培養した約1.0mlのLBのKnブロス培養液を、1.5ml用のポリプロピレンチューブに移し、Beckman社製の微量遠心分離機により遠心分離して(約3分、室温、約12,000 × g)細胞を回収した。細胞のペレットは、約200 µlの滅菌水中に懸濁し、約10 µlのアリコートを用いて、BASB059の順方向および逆方向の両増幅プライマーを含有するPCR反応液(最終容量を約

50 μ lとした)を調製した。PCR反応液成分の最終濃度は、約5.0ユニットのTaqポリメラーゼを用いた以外は、実施例2で指定した濃度と実質的に同じ濃度とした。

【0179】

最初の95 °Cの変性ステップは、細菌細胞の熱破壊およびプラスミドDNAの遊離を確実にするために3分間に増やした。ABIモデル9700サーマルサイクラーを使用し、かつ32サイクル、3段階の熱増幅プロフィール（即ち、95 °Cで45秒、55～58 °Cで45秒、72 °Cで1分）を用いて、溶解した形質転換体サンプルからBASB059のPCR断片を増幅した。熱増幅に続いて、該反応液の約20 μ lのアリコートのアガロースゲル電気泳動（Tris-酢酸-EDTA(TAE)バッファー中0.8%のアガロース）で解析した。DNA断片は、ゲル電気泳動とエチジウムブロマイド染色の後に、UV照射により可視化した。DNA分子量標準物（1Kbラダー、Life Technologies）を試験サンプルに平行して電気泳動し、PCR産物の大きさを推定するのに用いた。予測どおりのPCR産物を産生する形質転換体を、BASB059発現構築物を含有する株として同定した。その後、発現プラスミドを含有する株を組換えBASB059の誘導性発現について解析した。

【0180】

C：PCR陽性形質転換体の発現解析

上記で同定された各PCR陽性形質転換体について、継代プレートからの細胞を約5.0mlのカナマイシン（100 μ g/ml）含有LBブロスに接種し、振盪（約250rpm）しながら37 °Cで一晩増殖させた。一晩増殖させた種培養物のアリコート（約1.0ml）を、約25mlのLBのKnブロスを含む125mlの三角フラスコに接種し、培養物の濁度がO.D.600で約0.5になるまで、即ち対数増殖中期に至るまで（通常、約1.5～2.0時間）、振盪させながら（約250rpm）37 °Cで増殖させた。この時点で、該培養物の約半分（約12.5ml）を2つめの125mlフラスコに移し、IPTG（滅菌水中に調製した1.0M保存液、Sigma）を最終濃度1.0mMになるように添加して、組換えBASB059タンパク質の発現を誘導した。IPTGで誘導した培養物および誘導していない培養物両方ともを、振盪しながらさらに約4時間37 °Cでインキュベートを継続した。誘導時間経過後に、該誘導した培養物および誘導していない培養物の両方のサ

サンプル(約1.0ml)を採取し、微量遠心分離機で室温で約3分間遠心分離することにより、細胞を回収した。それぞれの細胞ペレットは、約50 μ lの滅菌水に懸濁した後、等量の2-メルカプトエタノール含有2Xレムリ(Laemmli) SDS-PAGEサンプルバッファーと混合し、約3分間沸騰水浴中に置いてタンパク質を変性させた。このIPTGで誘導した細胞の粗溶解液および誘導していない細胞の粗溶解液の両方の等容量(約15 μ l)を、二連の12%Tris/グリシンポリアクリルアミドゲル(厚さ1mmのミニゲル、Novex)にロードした。該誘導した細胞溶解液および誘導していない細胞溶解液のサンプルを着色済み分子量マーカー(SeeBlue、Novex)とともに、標準SDS/Tris/グリシン泳動バッファー(BioRad)を用いて通常の条件下で電気泳動した。電気泳動後、1枚のゲルは、新規のIPTG誘導性BASB059タンパク質を可視化するために、クマシーブリリアントブルーR250(BioRad)で染色した後、脱染色した。2枚目のゲルは、BioRad Mini-Protean II プロテイング装置およびタウビン(Towbin)のメタノール(20%)転写バッファーを用いて、4で約2時間かけてPVDF膜(孔サイズ0.45ミクロン、Novex)にエレクトロブロットした。膜をブロッキングした後、当技術分野で周知の方法により抗体とのインキュベーションを行った。抗(His)5モノクローナル抗体に続いて、HRPと結合したウサギ抗マウス二次抗体(QiaGen)を用いて、BASB059組換えタンパク質の発現と正体を確認した。抗ヒスチジン(His)抗体の反応パターンを、ABT不溶性基質、またはAmersham ECL化学発光システムを使用したHyperfilmのいずれかを用いて可視化した。

【0181】

実施例3：組換えBASB059の産生

細菌株

ナイセリア・メニンギチジス(*N.meningitidis*)由来のBASB059をコードするpET 24bプラスミドを含む大腸菌(*E.coli*)BL21DE3の組換え発現株を使用して、組換えタンパク質精製用に大量の細胞を調製した。該発現株を、確実にプラスミドを保持させるために、100 μ g/mlのカナマイシン(「Kn」)を含むLB寒天プレート上で培養した。-80での凍結保存のために、上記株を、上記と同濃度の抗生物質を含むLBブロス中で増殖させ、続いて等量の30%(w/v)グリセロール含有LBブロス

と混合した。

【0182】

培地

組換えタンパク質産生に用いた発酵培地は、100 µg/mlのKnを含有する2X YTブロス (Difco) からなる。発酵槽の培地に、消泡剤 (Antifoam 204, Sigma) を0.25ml/Lにて添加した。BASB059組換えタンパク質の発現を誘導するために、IPTG (イソプロピル -D-チオガラクトピラノシド) を該発酵槽に加えた (最終濃度1 mM)。

【0183】

発酵

種培養用の、50mlの作業容量を含む500ml三角フラスコに、解凍した凍結培養物0.3ml、または寒天プレート選択培養物由来の数個のコロニーを接種し、150rpmにて振盪台 (Innova 2100, New Brunswick Scientific) 上で、 37 ± 1 °Cにて約12時間インキュベートした。次いでこの種培養物を、2X YTブロスおよび抗生物質Knの両方を含有する5L作業容量の発酵槽に接種した。発酵槽 (Bioflo 3000, New Brunswick Scientific) は、 37 ± 1 °C、0.2~0.4VVMでのエア・スパージ、ラッシュトン攪拌翼を250rpmとして、運転した。pHについては、種培養フラスコまたは発酵槽のいずれにおいても調整しなかった。発酵中、発酵槽中のpHは6.5~7.3の範囲であった。培養物が対数増殖中期 (約0.7 O.D.600ユニット) に達した時、IPTG (滅菌水にて調製した1.0M保存液) を発酵槽に加えた。細胞を2~4時間誘導した後、28RS Heraeus (Sepatech) またはRC5C高速遠心分離機 (Sorvall Instruments) のいずれかを用いて、遠心分離により回収した。細胞ペーストは次に処理するまで-20 °Cで保存した。

【0184】

精製

イミダゾール、およびバイオテクノロジー用またはより高い等級の試薬は、全てAmeresco Chemical, Solon, Ohioから入手した。Triton X-100 (t-オクチルフェノキシポリエトキシ-エタノール)、Triton X-114、リン酸ナトリウム、リン酸2水素カリウム(monobasic)、および尿素は、試薬等級またはより高い等級のも

のであり、Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouriから入手した。ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水(1×PBS)は、Quality Biological, Inc., Gait hersburg, Marylandから入手した。ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水(10×PBS)は、Bio Whittaker, Walkersville, Marylandから入手した。His5抗体(BSA 不含)は、QiaGen, Valencia, Californiaから入手した。ペルオキシダーゼ結合アフィニティー精製(AffiPure)ヤギ抗マウスIgGは、Jackson Immuno Research, West Grove, Pennより入手した。他の全ての化学物質は、試薬等級またはより高い等級のものであった。

【0185】

Ni-キレートセファロースFast Flow樹脂は、Pharmacia, Swedenから入手した。成形済みTris-グリシン4~20%および10~20%ポリアクリルアミドゲル、全ての泳動バッファーおよび溶液、SeeBlue 着色済みスタンダード、MultiMark Multi-Colored スタンダード、およびPVDF転写膜を、Novex, San Diego, Californiaから入手した。SDS-PAGE銀染色キットは、第一化学薬品株式会社(東京, 日本)から入手した。クマシー染色液は、Bio-Rad Laboratories, Hercules, Californiaから入手した。Acrodisc(登録商標) PF 0.2 mシリンジフィルターは、Pall Gelman Sciences, Ann Arbor, Michiganから入手した。GD/X 25mm使い捨て用シリンジフィルターは、Whatman Inc., Clifton, New Jerseyから入手した。透析チューブ8,000 MWCOは、BioDesign Inc. Od New York, Carmal New Yorkから入手した。BCAタンパク質アッセイ試薬およびSnake Skin透析チューブ3,500 MWCOは、Pierce Chemical Co., Rockford, Illinoisから入手した。

【0186】

抽出プロトコール

細胞ペーストを30~60分間かけて室温で解凍した。該細胞ペーストを破碎後、上清を1.0%Triton X114を用いて分離した。次いでこの画分を、10%グルセロールおよび0.005%Triton X100を含有するPBS(pH=7.5)中で平衡にしたニッケルキレートセファロースFast Flow樹脂上を通した。タンパク質を、200mMイミダゾールを含有する同様のバッファーで溶出した。該溶出物質を含有する画分を、2mM EDTA、10mM塩化ナトリウムおよび0.005%Triton X100を含有する50mM Tris-HCl

バッファー(pH7.5)の4倍容量中に希釈し、DEAE-セファロースFF樹脂を通した。該流出物を、回収し、3kDa遮断攪拌容器(stir cell)上で濃縮し、次いで0.1%Triton X100を含有するPBS(pH7.4)に対して透析した。

【0187】

最終製剤

BASB059を、0.1%Triton X-100および1×PBS(pH7.4)に対して、これを3回交換しながら一晩かけて透析することにより、製剤化した。精製したタンパク質を特性解析して、後述のように抗体産生に用いた。SDS-PAGEの結果(図1A)から、90%を上回る程度まで精製された約10kDaのタンパク質のバンドが認められ、さらにこのタンパク質は、ウェスタンブロット(図1B)により抗His抗体と反応することが分かる。

【0188】

生化学的特性解析：SDS-PAGEおよびウェスタンブロット解析

組換え精製タンパク質を、4~20%ポリアクリルアミドゲルで分離し、すでに記載されている通りに(Thebaineら 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350-4354)、100Vで1時間かけて電気泳動的にPVDF膜に転写した。次にPVDF膜を、5%脱脂粉乳を含有する25mlのダルベッコリン酸緩衝生理食塩水で前処理した。以降のインキュベーションは、全てこの前処理バッファーを用いて行った。

【0189】

PVDF膜は、抗His末端抗体の希釈液と共に、室温で1時間インキュベートした。次いでPVDF膜を、洗浄バッファー(150mM塩化ナトリウムおよび0.05%Tween-20を含有する20mM Trisバッファー(pH7.5))で2回洗浄した。PVDF膜は、ペルオキシダーゼ標識種特異的コンジュゲートの1:5000希釈液25mlと共に、室温にて30分間インキュベートした。次にPVDF膜を洗浄バッファーで4回洗浄し、Zymed(San Francisco, CA)を添加した3-アミノ-9-エチルカルバゾールおよび過酸化尿素で、各々10分間ずつ染色した。

【0190】

実施例4：組換えBASB059によるマウスの免疫感作

大腸菌で発現した部分的精製組換えBASB059タンパク質を、Balb/Cマウスに0日

目、14日目および28日目に3回注射した(10匹/群)。100 μg の AlPO_4 に吸着させたものか、あるいはSBAS2エマルジョン(1回用量当たり、5 μg のMPLおよび5 μg のQS21を含むSB62エマルジョン)中に製剤化したものである、異なる2種の製剤とした約5 μg の抗原をマウスに皮下注射した。また本実験では、SBAS2エマルジョンのみで免疫感作したマウスからなる陰性対照群を追加した。特異的抗BASB059抗体を検出するために、28日目(2回目の14日後)および35日目(3回目の7日後)にマウスから採血した。特異的抗BASB59抗体を、 AlPO_4 製剤およびSBAS2製剤で別々に試験して得たプールされた血清(10マウス/群)に対してはELISAにより測定し、ならびに両方の製剤由来のプールされた血清(血清は、一緒に混合した)に対してはウェスタンブロッティングによって測定した。3回目の注射後の血清のみを使用した。図2に示された結果は、両方の製剤を用いたELISAによって特異的BASB059抗体応答があることを示しており、一方、抗-大腸菌(*E. coli*)抗体は、全く検出されない/低い程度で検出されたことを示す。両方の製剤は、抗体産生においてほとんど同等であった。この特異的Ab応答は、ウェスタンブロットによっても確認される(図3)。

【0191】

回復期患者由来の血清中の抗BASB059抗体の存在

本実験においては、幾人かの回復期患者の血清を、精製組換えBASB059タンパク質の認識についてウェスタンブロッティングにより試験した。

【0192】

簡単に述べると、部分的に精製されたBASB059ナイセリア・メニンギチジスBタンパク質6 μg を、電気泳動による移動のためにSDS-PAGE勾配ゲル(4~20%、Novex、コード番号EC6029)に加える。タンパク質を、Bio-rad トランスブロットシステム(コード番号170-3930)を用いて、100ボルトで1.5時間かけてニトロセルロースシート(0.45 μm 、Bio-radコード番号162-0114)に転写する。その後、フィルターを室温にて一晩かけてPBS-0.05%Tween20でブロックした後、ヒト血清とともにインキュベートする。次いで回復期患者の血清を試験する。患者の血清番号は、262068、261732、262117、261659、261469、261979および261324である。これらの血清を、PBS-0.05%Tween20で100倍に希釈し、ミニブロッター(mini-blotte

r)システム(Miniprotean, Bio-Rad コード番号170-4017)を用いて、ニトロセルロースシート上で室温にて穏やかに振盪しながら2時間インキュベートする。PBS-0.05%Tween20中での5分間の洗浄ステップを3回繰り返した後、該ニトロセルロースシートを、同洗浄バッファーで1/500に希釈した適当なコンジュゲート(ヒツジ由来のビオチン化抗ヒトIg抗体、Amershamコード番号RPN1003)とともに穏やかに振盪しながら室温で1時間インキュベートする。該膜を、上記と同様に3回洗浄し、該洗浄バッファーで1/1000に希釈したストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ複合体(Amershamコード番号1051)を用いて攪拌しながら30分間インキュベートする。最後の洗浄ステップを3回繰り返した後、30mgの4-クロロ-1-ナフトール(Sigma)、10mlのメタノール、40mlの超純水および30 μ lのH₂O₂を含む50mlの溶液中で20分間インキュベートしている間に顕色がみられる。蒸留水で数回膜を洗浄している間に染色が停止する。

【0193】

図3および4に示した結果は、試験した7人の回復期患者すべてが、10kDaの主要なバンドに対して反応することを示す。このことは、BASB059タンパク質が可能性のある将来のワクチン候補物質として何らかの役割を果たすことができることを示唆する。

【0194】

配列情報

BASB059ポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列

配列番号 1

ATCC 13090株由来のナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)BASB059ポリヌクレオチド配列

```
ATGAACACACGCATCATCGTTTCGGCTGCGTTCGTTGCGTTGGCATTAGCAGGTTGCGGC
TCAATCAATAATGTAACCGTTTCCGACCAGAACTTCAGGAACGTGCCGCGTTTGCCCTTG
GGCGTCAGCCAAAATGCCGTAAAAATCAGCAACCGCAGCAATGAAAGCATA CGCATCAAC
TTTACCGCAACTGTGGGTAAGCGCGTGAGCCAATGCTATGTTACCAGTGTAATCAGCACA
ATCGGCGTTACCACTTCCGATGCAATTTGTTTGGGAGGCGGAACGCACAAAGGCAAAAGT
CAATGCAATGCTTTGCTTAAAGCGGCAGGCCGTTGCTAA
```

配列番号 2

配列番号1のポリヌクレオチド配列から推定されたナイセリア・メニンギチジス
(*Neisseria meningitidis*)BASB059ポリペプチド配列

MNTRIIIVSAAFVALALAGCGSINNVTVSDQKLQERAAFALGVSQNAVKISNRSNESIRIN
FTATVGRVVSQCYVTSVISTIGVTTSDAICLGGGTHKGKSGCNALLKAAGRC

配列番号3

AGG CAG AGG CAT ATG AAC ACA CGC ATC ATC GTT TC

配列番号4

AGG CAG AGG CTC GAG GCA ACG GCC TGC CGC TTT AAG C

【0195】

寄託物

ナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)B血清群株を含む寄託物(deposit)をAmerican Type Culture Collection(本明細書中では、「ATCC」と記す)に1997年6月22日に寄託し、寄託番号13090を得た。この寄託物は、ナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)(AlbrechtおよびGhon)と記載されており、ナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)分離株から構築した、凍結乾燥の1.5~2.9kbのインサートライブラリーである。この寄託物は、Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon. 8:1-15(1958)に記載されている。

【0196】

ナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)株の寄託物は、本明細書では「寄託株」または「寄託株のDNA」と称する。

【0197】

寄託株は、完全長BASB059遺伝子を含む。万一本明細書の配列の記述と矛盾する場合、寄託株に含まれるポリヌクレオチドの配列、ならびにそれによってコー

ドされる任意のポリペプチドのアミノ酸配列が優先される。

【0198】

寄託株の寄託は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の条項に基いてなされたものである。この株は、変更できず、特許発行の際には無制限または無条件に一般に公開される。寄託株は、単に当業者の便宜のために提供されるものであり、寄託が35U.S.C.第112条で要求されるような実施可能要件を満たす上で必要であるということを容認するものではない。

**INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL**

(PCT Rule 13bis)

<p>A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>62</u>, line <u>2-21</u></p>	
<p>B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/></p>	
<p>Name of depositary institution AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION</p>	
<p>Address of depositary institution (including postal code and country) 10801 UNIVERSITY BLVD, MANASSAS, VIRGINIA 20110-2209, UNITED STATES OF AMERICA</p>	
<p>Date of deposit 22 June 1997 (22.06.97)</p>	<p>Accession Number 13090</p>
<p>C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/></p>	
<p>In respect of those designations where a European Patent is sought, a sample of the deposited microorganism will be made available until the publication of the mention of the grant of the European Patent or until the date on which the application has been refused or withdrawn, only by issue of such a sample to an expert nominated by the person requesting the sample.</p>	
<p>D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)</p>	
<p>E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)</p>	
<p>The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")</p>	
<p style="text-align: center;">For receiving Office use only</p> <p><input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application</p> <p>Authorized officer</p>	<p style="text-align: center;">For International Bureau use only</p> <p><input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:</p> <p>Authorized officer</p>

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> SmithKline Beecham Biologicals S.A.

<120> Novel compounds

<130> BM45367

<160> 4

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 339

<212> DNA

<213> Neisseria Meningitidis

<400> 1

```

atgaacacac gcatcatcgt ttoggctgcg ttcgttgctg tggcattagc aggttgcggc      60
tcaatcaata atgtaaccgt ttocgaccag aaacttcagg aacgtgccgc gtttgccttg      120
ggcgtcagcc aaaatgccgt aaaaatcagc aaccgcagca atgaaagcat acgcatcaac      180
tttaccgcaa ctgtgggtaa gcgcgtgagc caatgctatg ttaccagtgt aatcagcaca      240
atcgggctta ccacttccga tgcaatttgt ttgggaggcg gaacgcacaa aggcaaaagt      300
caatgcaatg ctttgcttaa agcggcagcg cgttgctaa                                339

```

<210> 2

<211> 112

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 2

```

Met Asn Thr Arg Ile Ile Val Ser Ala Ala Phe Val Ala Leu Ala Leu
  1           5           10           15
Ala Gly Cys Gly Ser Ile Asn Asn Val Thr Val Ser Asp Gln Lys Leu
           20           25           30
Gln Glu Arg Ala Ala Phe Ala Leu Gly Val Ser Gln Asn Ala Val Lys
  35           40           45

```

```

Ile Ser Asn Arg Ser Asn Glu Ser Ile Arg Ile Asn Phe Thr Ala Thr
   50           55           60
Val Gly Lys Arg Val Ser Gln Cys Tyr Val Thr Ser Val Ile Ser Thr
   65           70           75           80
Ile Gly Val Thr Thr Ser Asp Ala Ile Cys Leu Gly Gly Gly Thr His
           85           90           95
Lys Gly Lys Ser Gln Cys Asn Ala Leu Leu Lys Ala Ala Gly Arg Cys
           100          105          110

```

```

<210> 3
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Primer

```

```

<400> 3
aggcagaggc atatgaacac acgcatcacc gtttc                               35

```

```

<210> 4
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Primer

```

```

<400> 4
aggcagaggc tcgaggcaac ggccctgccgc ttttaagc                             37

```

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、組換え精製BASB059の解析結果を示す。A. 精製BASB059のクマシー染色SDSポリアクリルアミドゲル。B. 抗ヒスチジン免疫試薬を用いた精製BASB059のウェスタンブロット。

【図2】

図2は、Balb/CマウスにおけるBASB059タンパク質の免疫原性を示す。

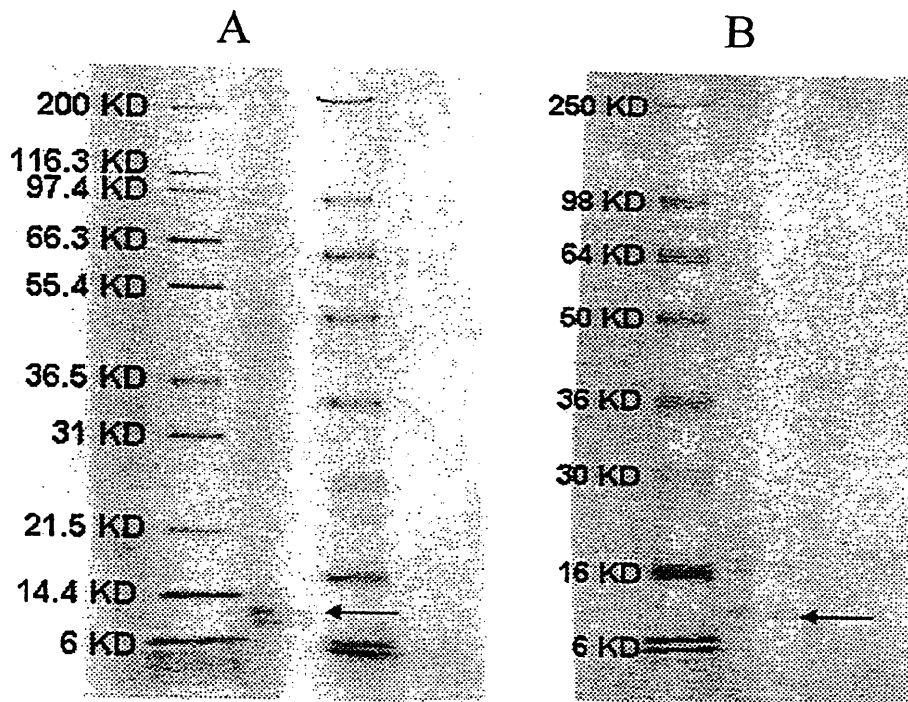
【図3】

図3は、回復期患者の血清および免疫感作したマウス中の抗BASB059抗体を示す。

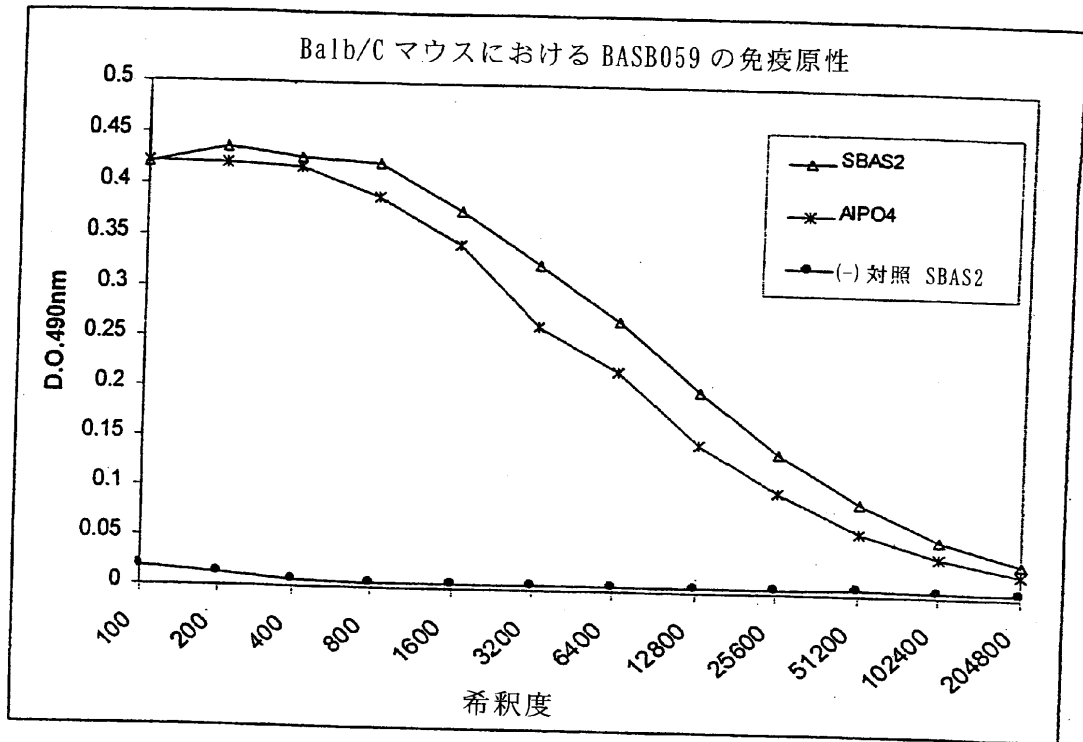
【図4】

図4は、回復期患者の血清および免疫感作したマウス中の抗BASB059抗体を示す。

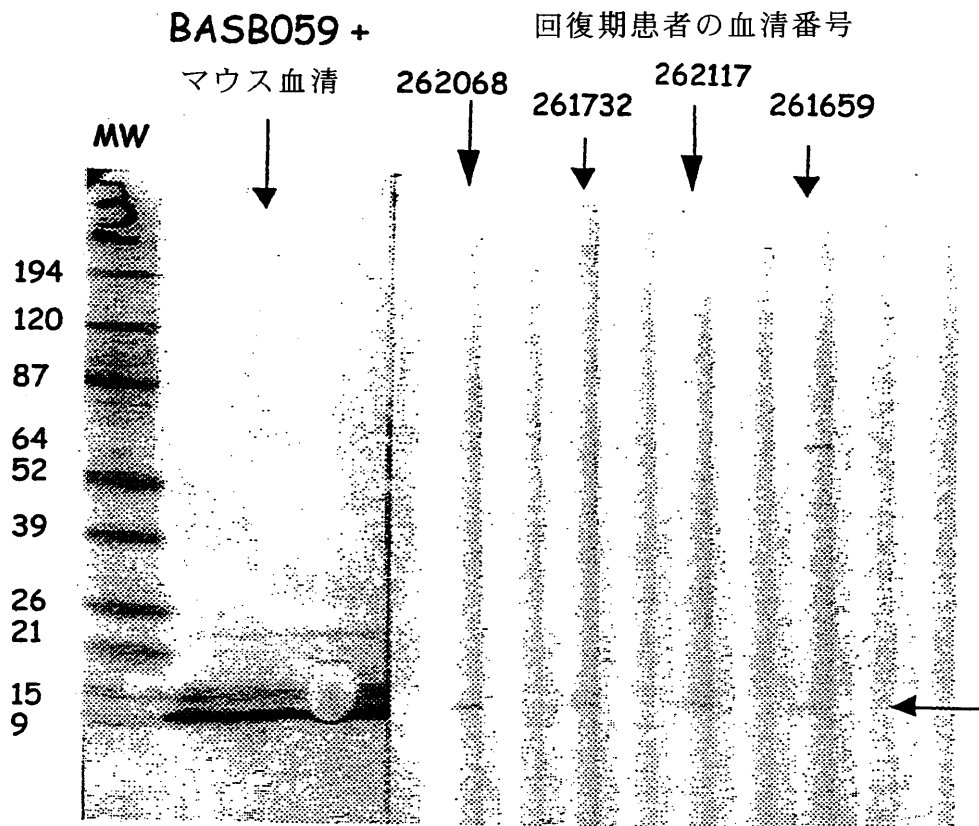
【図1】



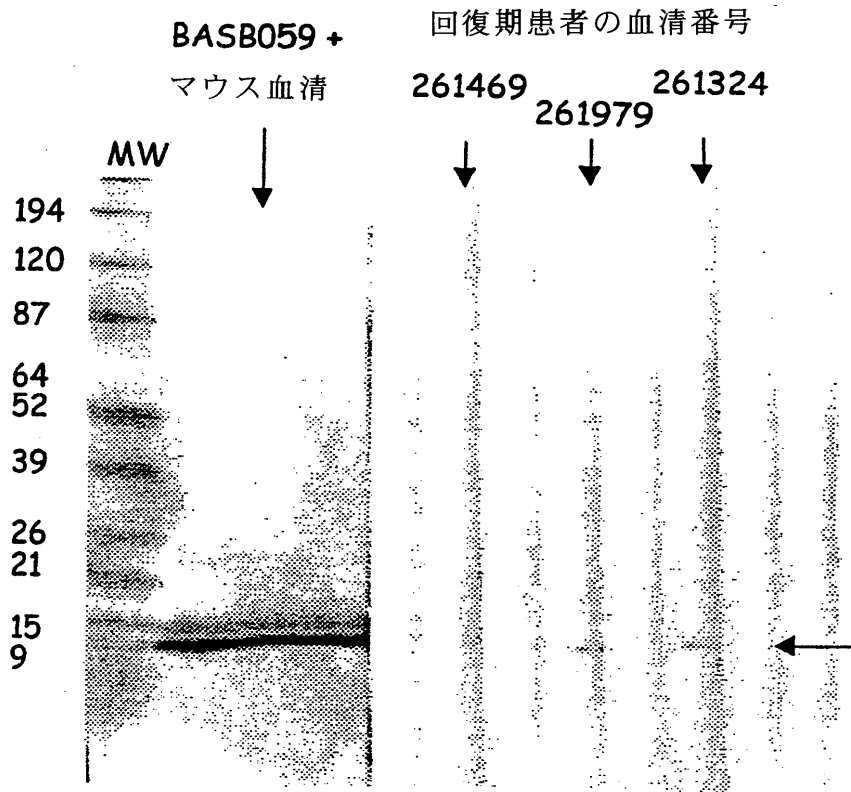
【図2】



【図3】



【図4】



【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/EP 00/00561
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C12N15/31 G01N33/68	C12N1/21 A61K39/095
	C12Q1/68 A61K39/40	C07K14/22 A61K48/00
		C07K16/12
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C12Q C12N G01N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) STRAND		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 02547 A (INST NAT SANTE RECH MED ;MAX PLANCK GESELLSCHAFT (DE); SMITHKLINE) 22 January 1998 (1998-01-22) SEQ ID NO: 89 claims 1,11,12,14-23,28-32; figures 2,11; example 4 page 9, line 33 -page 12, line 18	1-18
A	POOLMAN J T: "DEVELOPMENT OF A MENINGOCOCCAL VACCINE" INFECTIOUS AGENTS AND DISEASE,US,RAVEN PRESS, vol. 4, no. 1, 1995, pages 13-28-28, XP000876540 ISSN: 1056-2044 page 20, column 2 -page 23; figure 7; tables 3-5	1-18
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date		"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 30 June 2000		Date of mailing of the international search report 06/07/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 eponl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer van Klompenburg, W

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 00/00561

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 419 238 A (WELLCOME FOUND) 27 March 1991 (1991-03-27) page 4, line 22 - line 26; claims 1-13 -----	1-18
E	WO 00 26375 A (INST NAT SANTE RECH MED ; PASTEUR MERIEUX SERUMS VACC (FR); NASSIF) 11 May 2000 (2000-05-11) SEQ ID NOs: 9,10 claims 1-8 -----	1-8

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/00561

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9802547 A	22-01-1998	FR 2751000 A	16-01-1998
		AU 3697797 A	09-02-1998
		EP 0951552 A	27-10-1999
EP 0419238 A	27-03-1991	AU 6269190 A	11-04-1991
		CA 2025684 A	21-03-1991
		JP 3187397 A	15-08-1991
		US 5246851 A	21-09-1993
		ZA 9007279 A	27-05-1992
WO 0026375 A	11-05-2000	FR 2785293 A	05-05-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト'(参考)	
C 0 7 K	14/22	C 1 2 N	1/15	4 H 0 4 5
	16/12		1/19	
C 1 2 N	1/15		1/21	
	1/19	C 1 2 P	21/02	C
	1/21	G 0 1 N	33/53	N
	5/10		33/569	F
C 1 2 P	21/02	C 1 2 N	15/00	Z N A A
G 0 1 N	33/53		5/00	A
	33/569	A 6 1 K	37/02	

(81)指定国 E P (A T , B E , C H , C Y ,
 D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I
 T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J
 , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L ,
 M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K
 E , L S , M W , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W
) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U ,
 T J , T M) , A E , A L , A M , A T , A U , A Z ,
 B A , B B , B G , B R , B Y , C A , C H , C N , C
 R , C U , C Z , D E , D K , D M , E E , E S , F I
 , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D ,
 I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K
 Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A
 , M D , M G , M K , M N , M W , M X , N O , N Z ,
 P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S
 K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G
 , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA13 BA50 CA01 GA11
 GA27 HA12
 4B064 AG31 CA02 CC24 DA01 DA15
 4B065 AA01Y AB01 BA01 CA24
 CA25 CA45 CA46
 4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA21
 BA23 CA04 DA42 NA10 NA14
 ZB092 ZB352
 4C085 AA03 BA16 CC07 CC21 EE01
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA11
 DA86 EA31 EA52 FA74

专利名称(译)	BASB 059多肽来自脑膜炎奈瑟氏球菌		
公开(公告)号	JP2002537764A	公开(公告)日	2002-11-12
申请号	JP2000596146	申请日	2000-01-25
[标]申请(专利权)人(译)	史克必成生物兴业ANONYME		
申请(专利权)人(译)	史克必成生物兴业ANONYME		
[标]发明人	ソナードジョエル		
发明人	ソナード,ジョエル		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/095 A61P31/04 A61P37/04 C07K14/22 C07K16/12 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/31 C12P21/02 G01N33/569		
CPC分类号	A61P31/04 A61P37/04 C07K14/22		
FI分类号	A61K39/095 A61P31/04 A61P37/04 C07K14/22 C07K16/12 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C G01N33/53.N G01N33/569.F C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA13 4B024/BA50 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/GA27 4B024/HA12 4B064/AG31 4B064/CA02 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA15 4B065/AA01Y 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA21 4C084/BA23 4C084/CA04 4C084/DA42 4C084/NA10 4C084/NA14 4C084/ZB092 4C084/ZB352 4C085/AA03 4C085/BA16 4C085/CC07 4C085/CC21 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/EA52 4H045/FA74		
优先权	1999002070 1999-01-29 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了BASB059多肽和编码BASB059多肽的多核苷酸，以及重组产生这种多肽的方法。它还可用于诊断，预防和治疗。

